

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Tierexperimentelle Untersuchungen
über die pyrogene Aktivität von
Myxoviren und bakteriellen Toxinen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

1967

vorgelegt von
Gisela Schmidt
aus Göttingen

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Tierexperimentelle Untersuchungen
über die pyrogene Aktivität von
Myxoviren und bakteriellen Toxinen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gisela Schmidt
aus Göttingen

1. Referent: Prof. Dr. med. vet. Hans Hartwigk
2. Referent: Prof. Dr. phil. Gerhard Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 6.11.1967

Tag der Promotion

22 DEZ. 1967



Meinen lieben Eltern gewidmet

Vorwort

Die virologisch-bakteriologischen Untersuchungen wurden von mir im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt durchgeführt. Für die Überlassung des Themas, die Förderung der Arbeit und die persönliche Anteilnahme danke ich Herrn Prof. Dr. Schmidt herzlich.

Besonders dankbar bin ich seinem Mitarbeiter Privatdozent Dr. med. K. Großgebauer, der mir während meiner Arbeit mit wertvollen Ratschlägen stets zur Seite stand.

Auch bei Herrn Privatdozent Dr. med. V. Lenk bedanke ich mich vielmals für seine liebenswürdige Hilfsbereitschaft.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin. Für die großzügige Hilfe des Leiters dieses Institutes, Herrn Prof. Dr. med. W. Schwarz, und seiner Mitarbeiter, der Herren Privatdozenten Dr. med. H.J. Merker und Dr. med. J. Wollf, spreche ich meinen aufrichtigen Dank aus.

Für das Poliomyelitisvirus-Material, das mir die Herren Privatdozenten Dr. med. W. Diefenthal und Dr. med. K.O. Habermehl aus der virologischen Abteilung des Städtischen Wenckebach-Krankenhauses freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben, gilt mein herzlicher Dank.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. EINLEITUNG

I. Allgemeines über Pyrogene	1
II. Problematik des Pyrogenbegriffs	3
III. Die Terminologie der pyrogenen Reaktion	5
IV. Der Pyrogennachweis im Kaninchenversuch nach dem DAB 6, 3. Nachtrag	
1. Durchführung des Pyrogentestes	6
2. Bewertung des Versuchsausfalles	7
V. Zur Fieberwirkung von bakteriellen Endo- toxinen und Viren	
1. Stoffliche Natur und biologische Eigen- schaften bakterieller Endotoxine	
a) Stoffliche Natur	10
b) Biologische Eigenschaften	10
2. Aufbau und biologische Eigenschaften von Myxoviren	12
3. Vergleichende Betrachtungen über In- fluenzaviren und bakterielle Endotoxine bezüglich ihrer pyrogenen Eigenschaften ..	15
4. Zum Wirkungsmechanismus viraler und bakterieller Pyrogene	18
VI. Fragestellungen der Arbeit	19

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Material und Methoden	
1. Durchführung des Pyrogentestes (Kaninchenversuche)	26
2. Virusmaterial: Influenza-, Newcastle Disease- und Poliomyelitisviren	27
a) Virusgewinnung	27

b) Bestimmung des Virushämagglutinationstiters	29
c) Bestimmung der ID ₅₀	29
3. Virusanreicherungsverfahren	
a) Erythrozyten-Adsorptions-Elutionsverfahren	30
b) Ultrazentrifugation	30
4. Virusvorbehandlung mit	
a) Hydroxylamin	31
b) Natriumnitrit	31
c) Hitze	32
d) Diäthyläther	32
e) Phenol	32
f) Polykationen (Lysozym bzw. Protaminsulfat)	33
5. Gewinnung von interferonreichen Myxovirus-Allantoisflüssigkeiten	33
6. Fiebertoleranzversuche mit Influenzaviren und Hefe-Ribonukleinsäure	33
7. Tierversuche zur Übertragung des endogenen, leukozytären Pyrogens	34
8. Bakteriellcs Endotoxin	
a) Endotoxinnachweis im embryonierten Hühnerei ("i.v.-Technik")	34
b) Endotoxinnachweis im Kaninchentest ("Pyrogentest")	34
9. Nachweis von Staphylokokkenpyrogenen im Kaninchentest	37
10. Nachweis der fiebererzeugenden Wirkung von Hefe-Ribonukleinsäuren	37
11. Elektronenmikroskopische Studien an normalen und Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviren	37

II. Ergebnisse

1. Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit Myxoviruspräparationen (ohne physikalische und chemische Vorbe- handlung der Viruspartikel)	39
2. Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit Influenzaviruspräparationen (mit physikalischer und chemischer Vorbe- handlung, ausgenommen die Inaktivierungs- versuche mit Hydroxylamin)	44
3. Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit Influenzaviruspräparationen (Inaktivierungsstudien mit Hydroxylamin)..	46
4. Pyrogenitätsversuche mit Myxoviruspräpa- rationen (Einfluß von Polykationen auf die Viruspyrogenität)	48
5. Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit bakteriellem Lipopolysaccharid (ohne chemische Vorbehandlung)	57
6. Pyrogenitätsversuche mit bakteriellem Lipopolysaccharid (ohne bzw. mit che- mischer Vorbehandlung)	59
7. Pyrogenitätsversuche mit Hefe-Ribonuklein- säure (Einfluß von Lysozym auf Hefe-RNS)..	61
8. Fieberwirkung von Kaninchenserum (Tier- versuche zur Übertragung des endogenen, leukozytären Pyrogens)	63
9. Pyrogenitätsversuche mit Poliomyelitis- viruspräparationen	65
10. Versuche, mit unvorbehandeltem Influenza- virusmaterial eine homologe pyrogene Tole- ranz auszulösen	67

11. Versuche, mit interferonreichen Allantoisflüssigkeiten eine pyrogene Toleranz gegen Influenzaviren auszulösen	69
12. Versuche, mit Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviruspartikeln eine pyrogene Toleranz gegen unvorbehandelte Viren auszulösen (1-, 2- und 3-tägige Einwirkungszeit des Hydroxylamins)	71
13. Versuche, mit Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviruspartikeln eine pyrogene Toleranz gegen unvorbehandelte Viren auszulösen (4-tägige Einwirkungszeit des Hydroxylamins).....	72
14. Versuche, mit Hefe-Ribonukleinsäure eine homologe pyrogene Toleranz auszulösen	74
15. Pyrogenitätsversuche mit Staphylokokken-suspensionen	76

C. DISKUSSION

I. Virusinaktivierungsstudien mit Hydroxylamin	82
--	----

II. Untersuchungen zur Beeinflussung der pyrogenen Viruswirkung durch Lysozym	86
---	----

III. Wesentliche Diskussionspunkte zu den übrigen experimentellen Abschnitten	87
---	----

D. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	89
---------------------------------	----

E. <u>SCHRIFTTUMVERZEICHNIS</u>	91
---------------------------------------	----

A. EINLEITUNG

I. Allgemeines über Pyrogene

Die Beobachtung, daß beim Menschen im Verlaufe von Infektionserkrankungen erhöhte Temperaturen auftreten können, ist alt. Das Symptom "Fieber" wird auch heute noch vom klinischen Arzt sorgfältig beachtet, registriert und diagnostisch verwertet. Seit langem weiß man aber auch, daß nicht nur im Zusammenhang mit Krankheiten Fieberzustände zu beobachten sind, sondern (im Tierversuch) u.a. auch nach parentaler Applikation von Protein (z.B. Milch), von destilliertem Wasser, Zucker- und Salzlösungen sowie bakteriellem Material (z.B. Eiter). (Übersichten bei Valyi-Nagy u. Kelentey, 1959; Wendt, 1959; Gimborn, 1963; Seibert, 1963; Atkins u. Snell, 1965; Wood, 1965; Cranston, 1966; Eichenberger, 1966; Göing u. Kaiser, 1966; Großgebauer, 1967c). Die grundlegenden Untersuchungen von Hort und Penfold (u.a. 1911, 1912) führten zur Aufklärung dieses "Infektionsfiebers". In vielen Fällen wurden als Ursache für diese Fieberzustände Verunreinigungen durch toxische, hitzestabile und filtrierbare bakterielle Substanzen erkannt; ein Befund, der insbesondere von Seibert und Mitarbeitern (Seibert, 1923; Seibert u. Mendel, 1923) bestätigt werden konnte.

In den folgenden Jahren beschäftigte sich eine Reihe von Forschern mit der biologischen Wirkung derartiger mikrobieller Substanzen, die später allgemein als Pyrogene oder bakterielle Endotoxine bezeichnet wurden (siehe u.a. bei Bennett, 1948 u. 1948a)⁺. Wesentliche Erkenntnisse bestanden darin, daß die am stärksten fiebererzeugenden Stoffe von gramnegativen Bakterien stammen und, daß schon geringste Mengen, ca. 0,0002 /kg Körpergewicht, im Kaninchentest zum Beispiel Temperaturerhöhungen hervorrufen. Somit ge-

⁺ Den Namen Pyrogene verwandte allerdings erstmalig Billroth schon im Jahre 1865 (zit. aus DAB 6, 3. Nachtrag).

hören diese bakteriellen Endotoxine zu den biologisch wirksamsten Substanzen überhaupt. Diese Tatsache erschwert die Beurteilung früherer Befunde, nach denen Gewebshomogenate im Tierversuch Fieber hervorrufen ("Gewebspyrogene"). In vielen Fällen muß jedoch eine bakterielle Verunreinigung als eigentliche Fieberursache angenommen werden (Menkin, 1956; Bennett u. Beeson, 1953; Merler u. Mitarb., 1960). Vermutlich gibt es aber auch "echte" Gewebspyrogene (Snell u. Atkins, 1965).

Einen vorläufigen Abschluß fanden diese Untersuchungen durch die Studien von Westphal, Lüderitz, Morgan, Göbel, Neter und Eichenberger (siehe bei Göing u. Kaiser, 1966; Eichenberger, 1966 sowie Westphal u. Lüderitz, 1954) über den Endotoxinkomplex und seine biologischen Eigenschaften (Neter u. Mitarb., 1956; Hammer u. Mitarb., 1958; Lüderitz u. Mitarb., 1958 sowie Westphal u. Mitarb., 1958). Danach ist die Pyrogenität des Komplexes an ein keimunspezifisches Phospholipid ("Lipoid A") gebunden.

Aber auch grampositive Bakterien, Pilze, verschiedene Viren und Extrakte bestimmter Normalgewebe erwiesen sich - meist im Kaninchentest - als pyrogen (Übersicht bei Atkins u. Snell, 1965).

Seit der Entdeckung des ursächlichen Zusammenhanges zwischen dem "Injektionsfieber" und den mikrobiellen Verunreinigungen parenteral zu verabreichender Lösungen arbeitet man intensiv an der Verhütung solcher Kontaminationen.

Die parenterale Applikation mikrobieller Pyrogene führt beim Menschen zu Krankheitsbildern (Schüttelfrost, Kopfschmerz, allgemeines Krankheitsgefühl, Kollapsneigung), die zwar meist nur bei Schwerkranken lebensgefährlich sind, jedoch den Patienten stets zusätzlich und unnötig belasten. Aus diesem Grunde müssen Injektions- und Infusionslösungen nach den Vorschriften des Deutschen Arzneibuches 6. Ausgabe (DAB 6), 3. Nachtrag frei von wirksamen Pyrogenmengen sein, wenn sie in Einzelmengen über 10 ml verabreicht werden. Der Pyrogentest beruht auf Kaninchenversuchen; Näheres siehe unter A. IV. 1. und 2.

Die Herstellung pyrogenfreier Arzneimittellösungen, auch pyrogenfreien Wassers und die Entfernung pyrogener Verunreinigungen aus ihnen sowie aus Infusions- und Transfusionsgeräten, Spritzen und anderem Sterilisiergut wird dadurch erschwert, daß die (häufig auftretenden) bakteriellen Endotoxine filtrierbar und außerordentlich hitzestabil sind (siehe z.B. bei Rudat, 1955 und Schmidt, 1955 sowie Schmidt u. Blass, 1955). Über Möglichkeiten zur Lösung dieser Probleme liegen daher zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten vor, auf die hier im Einzelnen nicht eingegangen werden soll.

Aber auch der Wirkungsmechanismus der mikrobiellen Pyrogene ist Gegenstand intensiver Studien. Schließlich liegen Befunde über pyrogene Viren und die stoffliche Natur exogener Viruspyrogene vor (siehe A. V. 1. bis 4.). Hiermit hofft man, Aufschluß über die Pathogenese des Fiebers beim Menschen zu erhalten. Allerdings sind Rückschlüsse vom künstlichen Modell, d.h. vom experimentellen Kaninchentest, auf die Verhältnisse beim Menschen nur bedingt möglich. Versuche am Menschen wurden vergleichsweise nur in spärlicher Zahl durchgeführt, so daß die Frage der Pyrogenempfindlichkeit des Menschen noch nicht sicher geklärt ist.

II. Problematik des Pyrogenbegriffs

Im Kommentar des DAB 6, 3. Nachtrag zur Prüfung auf pyrogene Stoffe werden als Pyrogene solche Verunreinigungen bezeichnet, "die Lösungen von Medikamenten zur parenteralen Injektion die Eigenschaft verleihen, Fieber zu erzeugen" (Hecht, 1959). Das entscheidende Kriterium für den Nachweis von Pyrogenen ist eine Erhöhung der Rektaltemperatur des Kaninchens nach intravenöser Gabe bestimmter Mengen der Arzneimittellösung. Offensichtlich kann jedoch die Erhöhung der Körpertemperatur beim Versuchstier wie auch beim Menschen auf verschiedenen Mechanismen beruhen. So liegen Angaben darüber vor, daß es z.B. nach emotionellen Erregungen, bei Hyperthyreoidismus und in der postovulatorischen

Phase des Menstruationszyklus zu Temperaturerhöhungen kommt. Die Frage, ob solche Temperaturanstiege sowie passive Änderungen der Körpertemperatur (extrem hohe Wärmebildung oder -zufuhr) als echtes Fieber bezeichnet werden können, wird im allgemeinen verneint. Man ist vielmehr der Ansicht, daß es beim echten Fieber zu einer Verstellung der Regelmechanismen (siehe bei Wagner, 1961 und Bleichert, 1962) auf ein höheres Niveau kommt. Der sog. "Sollwert" des im Hypothalamus vermuteten Thermostaten wird danach nur auf einen sog. "Istwert" angehoben. Die Regelmechanismen werden nach diesen Vorstellungen weder geschädigt noch ausgeschaltet. Vermutlich wird während des echten Fiebers die Körpertemperatur ebenso reguliert wie beim Gesunden, wenn auch auf einer höheren Stufe. Allerdings ist der genaue Mechanismus der Temperaturregulierung noch weitgehend unbekannt. Insbesondere ist die Frage der Mitwirkung chemischer Überträgerstoffe (z.B. Noradrenalin und 5-Hydroxytryptamin) noch nicht geklärt (Übersichten siehe bei Cranston, 1966 sowie Cooper u. Cranston, 1966; Göing u. Kaiser, 1966; Großgebauer, 1967). Ein fiebervermittelnder Stoff, der vom exogenen Pyrogen (z.B. vom Bakterium oder Virus) aus Leukozyten freigesetzt wird, nämlich das endogene Pyrogen (siehe unter A. V. 4.), scheint spezifisch an Strukturen der pars anterior des Hypothalamus anzugreifen (Cooper u. Mitarb., 1966).

Nach Siegert u. Mitarbeiter (1963) kann man nun Substanzen, die die zentralen Regelmechanismen auf ein höheres Niveau heben, als Pyrogene bezeichnen. Diese Autoren weisen unseres Erachtens zurecht darauf hin, daß eine Messung der rektalen Temperatur streng genommen nicht ausreicht, echte Fieberzustände von anderen Temperaturerhöhungen abzugrenzen. Schließlich sind auch die Tierspezies, der Applikationsmodus des Materials (z.B. intraperitoneal, intravenös) sowie die Messdauer anzugeben, wenn die Lösung als pyrogen bezeichnet wird. Häufig werden zwar Kaninchen zu Untersuchungen auf Pyrogenität herangezogen, jedoch liegen - insbesondere zu wissenschaftlichen Studien - auch Befunde von Menschen, Pferden, Hunden, Katzen, Ratten, Hühnern, Meerschweinchen

und Mäusen vor. Diese Untersuchungen zeigen, daß die Pyrogenempfindlichkeit der verschiedenen Tierarten keinesfalls immer übereinstimmt (Siegert u. Mitarb., 1963), und daß die Auslösung pyrogener Reaktionen u.a. auch von der Injektionsmenge abhängig ist (siehe z.B. bei Zeller u. Oettel, 1965, 1965a).

Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß es Infektionserreger gibt, für die das Versuchstier empfänglich ist. Prüft man z.B. Vakzineviren nach dem Deutschen Arzneibuch, 3. Nachtrag, so erweisen sie sich als apyrogen (Siegert u. Mitarb., 1963). Nach einigen Tagen tritt aber ein natürliches Krankheits- oder Infektionsfieber auf (siehe auch bei Kirn u. Mitarb., 1966) das zweckmäßigerweise von einer eventuellen Temperaturerhöhung im Verlaufe des experimentellen Pyrogentestes abzutrennen ist (Siegert u. Mitarb., 1963). Ob die durch Pyrogene hervorgerufenen Temperatursteigerungen auf ähnlichen oder gleichen Wirkungsmechanismen beruhen wie die im Verlaufe einer natürlichen Infektion, kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

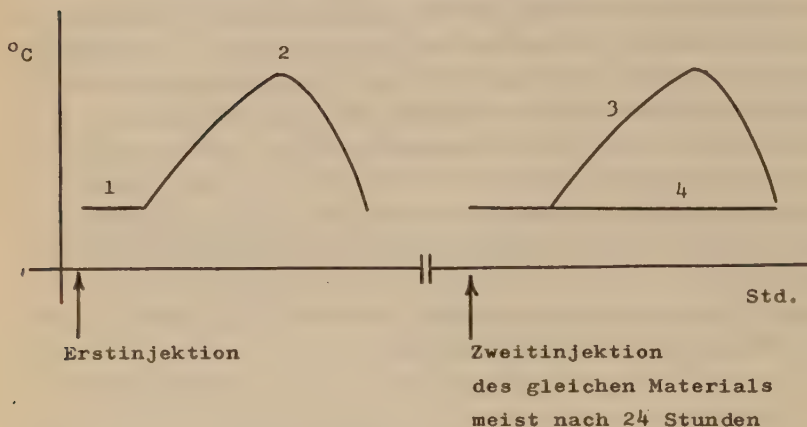
III. Die Terminologie der pyrogenen Reaktion

Mit der Erstinjektion wird das exogene Pyrogen (z.B. Bakterium oder Virus) zugeführt, das nach einer Latenzzeit (Zeit zwischen der Applikation der Probe und dem Beginn des Temperaturanstiegs - in der Abbildung 1 die Strecke 1 -) fiebererzeugend wirkt. Hierbei können sich mehrere Fiebergipfel ausbilden. Von theoretischer und praktischer Bedeutung ist der experimentelle Befund, daß eine erneute Zufuhr des (in quantitativer und qualitativer Hinsicht) gleichen exogenen Pyrogens zu einem Refraktärzustand (Hyporeaktivität) führt, der im allgemeinen als Toleranz bezeichnet wird (in der Abbildung 1 die Strecke 4). In diesem Stadium reagiert das Versuchstier entweder nicht (komplette Toleranz) oder geringer (inkomplette Toleranz) mit Fieber. Wie

unter A. V. 4. ausführlich beschrieben werden soll, wird das Fieber durch Freisetzung eines leukozytären körpereigenen (= endogenen) Pyrogens hervorgerufen (siehe auch Abbildung 8).

Abbildung 1

Zur Terminologie der pyrogenen Reaktion



Erläuterungen zur Abbildung 1:

- 1 Latenzzeit: 20 Min. bis zu 2 Std.; abhängig von der Art und Menge des Pyrogens
- 2 Fiebergipfel
- 3 Ausbleiben einer Toleranz (= Fiebereintritt)
- 4 Ausbildung einer Toleranz (= Wegfall des Fiebers)

IV. Der Pyrogennachweis im Kaninchenversuch
(siehe DAB 6, 3. Nachtrag)

- 1. Durchführung des Pyrogentestes (siehe auch Abbildung 3)

Im 3. Nachtrag zum DAB 6 sind verbindliche Vorschriften zur Durchführung des Pyrogentestes festgelegt: Dieser Test stellt ein Tierexperiment dar. Zunächst werden je 3 Kaninchen etwa 1/10 der therapeutisch üblichen Dosis

des Arzneimittels je Kilogramm Tier, höchstens aber 50 ml/kg Tier intravenös appliziert. Die Arzneimittellösung wird auf 20-38°C erwärmt. Über einen Zeitraum von 3 Stunden mißt man rektal in Abständen von 45 Minuten 4 mal die Temperaturen.

Die Tiere sollen ein Gewicht von mindestens 1,5 kg haben und in gleichmäßig temperierten Ställen in Einzelkäfigen gehalten werden. Ungeeignet sind Kaninchen, deren Rektaltemperaturen unter 38,5 und über 39,5°C liegen. Eine antigen wirkende Substanz darf bei ein und demselben Tier nur einmal appliziert werden. Alle Versuchstiere bleiben bis zum Ende der Temperaturmessungen ohne Nahrung.

Die zur Untersuchung notwendigen Spritzen, Kanülen und Glasgeräte müssen nach sorgfältiger Reinigung 2 Stunden im Heißluftsterilisator bei 180°C vorbereitet werden.

2. Bewertung des Versuchsausfalles

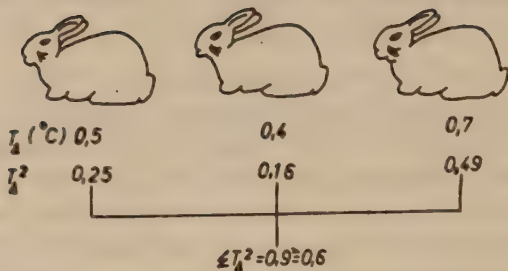
Die Ergebnisse der in 45-minütigem Abstand vorgenommenen 4 Temperaturmessungen werden folgendermaßen ausgewertet:

Zunächst bestimmt man die Temperatursteigerung, die sich aus der Differenz zwischen dem höchsten Wert dieser 4 Messungen und dem Ausgangswert ergibt.

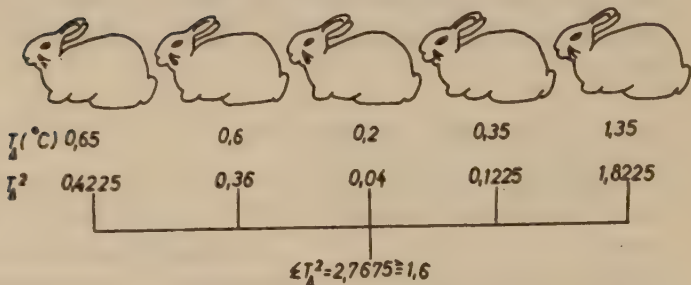
Ist die Summe der Quadrate dieser 3 Werte kleiner als 0,6, so wird das Mittel als pyrogenfrei bezeichnet.

Liegt sie zwischen 0,6 und 1,6, so wird die Prüfung auf weitere 5 Tiere ausgedehnt. Jetzt ist die Substanz pyrogenfrei, wenn die Summe der Quadrate aller 8 Temperaturmessungen nicht größer als 1,6 ist (siehe hierzu auch die Abbildung 2).

Abbildung 2



Erweiterung um 5 Kaninchen



Ermittlung einer pyrogenen Lösung
im Kaninchenversuch
nach dem DAB 6, 3. Nachtrag.

Zeichenerklärungen

T_{Δ} : Temperaturdifferenz zwischen der Ausgangs(=Normal-)temperatur und dem höchsten Meßwert.

T_{Δ}^2 : Quadrat der Temperatursteigerung.

$\sum T_{\Delta}^2$: Summe der Quadrate der Temperatursteigerungen.

Erläuterungen siehe Seite 7.

Abbildung 3

Haltekäfige mit Ver-
suchskaninchen in ei-
nem Gestell sowie das
Meßgerät der Firma
Hartmann u. Braun AG



V. Zur Fieberwirkung von bakteriellen Endotoxinen und Viren

1. Stoffliche Natur und biologische Eigenschaften bakterieller Endotoxine

a) Zur stofflichen Natur

Der biochemischen Forschung ist es gelungen, Einzelheiten über die chemische Natur des pyrogenen Prinzips der endotoxinbildenden Bakterien festzustellen (Literatur siehe unter A. I.).

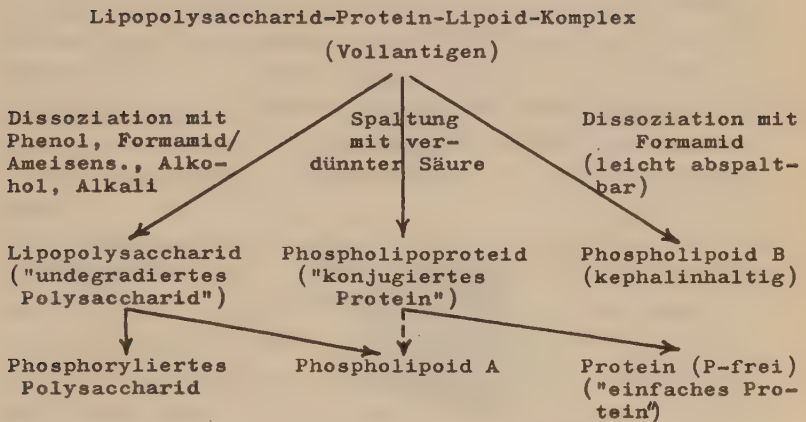
Endotoxine sind Bausteine gramnegativer Bakterien, in deren Außenschicht sie zusammen mit Proteinen und Phosphorsäureester als Komplexe liegen (= O-Antigene). Der Aufbau der O-Endotoxine (Lipopolysaccharidantigene) ist in der Abbildung 4 nach Angaben von Westphal (zit. nach Müller, 1963) zusammengestellt worden.

Wesentlich ist, daß die Aufspaltung der Lipopolysaccharide einen Polysaccharidanteil und ein Phospholipid ergibt. Das Phospholipid A besitzt alle endotoxischen Eigenschaften.

b) Biologische Eigenschaften

Unter entsprechenden Versuchsbedingungen konnten dem Endotoxin nicht nur Fieberwirkungen, sondern auch andere biologische Eigenschaften zugeordnet werden, wie z.B. Tumorzerfall, Adjuvanswirkung (Steigerung der Serumantikörperbildung), Auslösung des Schwartzman-Phänomens und Induktion einer Mitose bei Makrophagen (Forbes, 1965). Es konnte weiterhin festgestellt werden, daß auch bakterielle Endotoxine interferonähnliche Stoffe stimulieren (siehe auch unter V. 4.e) und daß Endotoxin keine einheitlich wirkende Substanz darstellt, sondern einen resistenzsteigernden und einen toleranzinduzierenden Faktor enthält (Übersicht siehe bei Großgebauer, 1967a).

Abbildung 4



Aufbau der O-Endotoxine (Lipopolysaccharid-Antigene) gramnegativer Bakterien (nach O. Westphal).

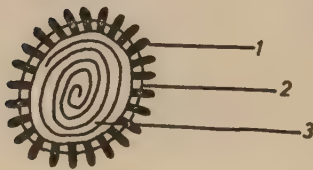
aus: Grundriß der medizinischen Immunologie
von Priv. Doz. Dr. Ferdinand Müller, 1963.
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.

2. Aufbau und biologische Eigenschaften von Myxoviren

Einen ganz anderen Aufbau weisen die in dieser Arbeit bevorzugt herangezogenen Myxoviren auf (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5

Schematische Darstellung
eines Myxovirus



1 Hämagglutinin- "Platten"

2 Lipoidmantel

3 "Innenkörper": soluble (S)-Antigen

Träger der genetischen Information

Diese Viren, zu denen neben den Influenzaviren (Typen A, B und C) u.a. noch die Parainfluenza-, Mumps- und Newcastle Disease-Viren gehören, stellen kompliziert zusammengesetzte Korpuskel dar. Auf ihre biologischen Eigenschaften geht Großgebauer (1966b) zusammenfassend ein. Außer reichlich vorhandenen Lipiden sind Kohlenhydrate, verschiedene Proteine und Ribonukleinsäure nachgewiesen worden (u.a. Frommhagen u. Mitarb., 1959). Der "Innenkörper", das sog. NP-(Nukleoprotein) oder S-(soluble) Antigen, ist der Träger der gesamten genetischen Information und serologisch mittels der Komplementbindungsreaktion, in der es typenspezifisch reagiert, nachweisbar.

Die Virusoberfläche ist aus Proteinen und Strukturen zusammengesetzt, von denen die hämagglutinierende und enzymatische Aktivität der Viren ausgehen. In der Komplementbindungsreaktion wirkt das komplette Virus stammspezifisch (Übersichten bei Brand, 1956; Großgebauer, 1962). Auf Grund ihres Lipidgehaltes lassen sich diese Viren durch Diäthyläther in Untereinheiten zerlegen (Hoyle, 1950, 1952; Davenport u. Mitarb., 1960); ein Prozeß, der mit dem Verlust der Infektiosität, Interferenz und Pyrogenität verbunden ist (siehe auch Abbildung 20). Während angenommen werden kann, daß die Infektiosität an die Ribonukleinsäure geknüpft ist, konnten für die biologischen Eigenschaften der Interferenz und Pyrogenität bisher mit der erforderlichen Exaktheit noch keine morphologischen Substrate gefunden werden. Vermutlich sind an der Auslösung der interferierenden Aktivität Nukleinsäurekomponenten beteiligt (Großgebauer, 1966). Das pyrogene Prinzip soll dagegen nach Siegert u. Mitarbeitern (1963) mit Lipoprotein identisch sein, zumal nach der Äthereinwirkung die pyrogene Aktivität erlischt (Siegert u. Braune, 1964, 1964a). Isolierte Virushämagglutinine, die weitgehend frei von solchen Lipiden sind, rufen auch beim Menschen kein Fieber mehr hervor (Davenport u. Mitarb., 1964).

Von den mannigfaltigen biologischen Eigenschaften der Myxoviren sei an dieser Stelle auf die pyrogene Aktivität ausführlicher eingegangen. Seit 1949 ist bekannt, daß auch Viren pyrogen sein können. Dieser Befund wurde am Influenzavirus erhoben (Bennett u. Mitarb., 1949; Wagner u. Mitarb., 1949). Eine Reihe von Untersuchungen hat sich in den folgenden Jahren mit dieser Eigenschaft befaßt (einige Ergebnisse siehe bei Siegert, 1957). Insbesondere interessierten folgende Fragen:

1. Welcher stofflichen Natur ist das pyrogene Prinzip, d.h. welchen Einfluß nehmen die verschiedensten physikalischen Einwirkungen und chemischen Mittel auf die Viruspyrogenität?
2. Welche Viren sind außer den Influenzaviren noch pyrogen?
3. Welche Gemeinsamkeiten und welche Unterschiede bestehen zwischen den bakteriellen Endotoxinen und viralen exogenen Pyrogenen?

Zu 1.

Zunächst stellte sich bei den enzymaktiven Influenzaviren die Frage nach dem Zusammenhang zwischen virusgerichteten Zellrezeptoren und der Viruspyrogenität. Durch vorherige Applikation von gereinigtem RDE (= "receptor-destroying-enzyme") konnte French (1952) keinen in vivo-Effekt beobachten. Allerdings steht dieser Befund im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wagner und Bennett (1950), die aber mit ungereinigtem RDE arbeiteten. Stickl und Böcker (1958) kamen auf Grund von in vitro-Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die Anwesenheit von intakten Rezeptoren Voraussetzung für die pyrogene Viruswirkung ist.

Inaktivierungsversuche mit Hitze, UV-Licht, Formalin, Diäthyläther und Hydroxylamin (Bennett u. Mitarb., 1949; Wagner u. Mitarb., 1949; Siegert u. Mitarb., 1963; Siegert u. Braune, 1964, 1964a; Schmidt u. Mitarb., 1966) lassen den Schluß zu, daß das Viruspyrogen ein Lipopolysaccharid oder Lipoprotein darstellt. Durch Lysozym soll

eine Abtrennung des pyrogenen Prinzips vom Viruselementarkörperchen möglich sein (Siegert u. Mitarb., 1967).

Zu 2.

Es hat sich herausgestellt, daß nicht nur Influenzaviren, sondern auch andere Myxoviren (z.B. Mumps- und Newcastle Disease-Viren) sowie Cocksackieviren pyrogen sein können (Siegert u. Mitarb., 1963; King, 1962, 1964).

Insbesondere der experimentelle Befund, daß lipidfreie(!) Cocksackieviren vom Typ B-1 pyrogene Eigenschaften besitzen (King, 1962, 1964), ist zunächst wenig vereinbar mit der Annahme, daß es sich bei dem stofflichen Träger der Viruspyrogenität i m m e r um Lipidstrukturen handelt. Siegert und Mitarbeiter (1963) unterscheiden apyrogene Viren, sicher pyrogene Viren und Viren mit fraglicher pyrogener Wirkung (siehe Abbildung 6).

Zu 3.

Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen bakteriellen Endotoxinen und viralen exogenen Pyrogenen sind aus der Übersicht (in Abbildung 7) ersichtlich. Hervorzuheben ist hier, daß die Endotoxine in kleineren Dosen wirken, hitzestabiler und durch spezifische Antikörper nicht neutralisierbar sind. Gemeinsam scheint beiden exogenen Pyrogenarten zu sein, daß sie nicht direkt auf das Wärmeregulationszentrum wirken, sondern auf dem Umweg über ein sog. leukozytäres endogenes Pyrogen (siehe Abbildung 7).

3. Vergleichende Betrachtungen über bakterielle Endotoxine und Influenzaviren bezüglich ihrer pyrogenen Eigenschaften

Im Folgenden sollen diese Betrachtungen in einem Schema zusammengefaßt werden. Aus diesem ist ersichtlich, daß es neben Gemeinsamkeiten auch stärkere Unterschiede zwischen diesen biologisch-aktiven Stoffen gibt.

Abbildung 6

Übersicht über das pyrogene Verhalten
verschiedener Virusarten im Kaninchentest (aus: Siebert u. Mitarb., 1963)

Pyrogene Viren	Dosis HAE	Apyrogene Viren	Dosis ID ₅₀	fragliche Wirkung	Dosis ID ₅₀
Influenza A	> 512	Polio Typ I	10 ^{8,5}	Echo Typ 9	10 ^{9,5}
B	"	II	10 ^{7,5}	Coxsackie A ₉	10 ^{9,5}
C	"	III	10 ^{7,5}		
Parainfluenza 1	"	Echo Typ 7	5 · 10 ⁷		
3	"	11	10 ^{9,5}		
		12	10 ^{8,5}		
Mumps	"	Adeno Typ 2	10 ^{5,5}		
NDV	"	Masern	10 ^{5,5}		
		Vaccinia	10 ⁹		

HAE = Hämagglutinierende Einheiten

Erläuterung siehe Seite 15

Gegenüberstellung von biologischen Eigenschaften bakterieller Endotoxine und Influenzaviren im Hinblick auf ihre Pyrogenität

Abbildung 7

Biologische Eigenschaften	bakterielle Endotoxine	Influenzaviren
Empfindlichkeit gegen Hitze	groß	gering
Neutralisierbar durch spezifische Antikörper	nein	ja
Wirksamer Anteil	Bestandteil eines gramnegativen Bakteriums	gesamtes Virion
Pyrogenes Prinzip vermutlich gebunden an:	Lipoid A	Oberflächenlipoproteine?
Latenzzeit	kurz	lang
Ausbildung einer Toleranz	oft inkomplett	oft komplett
Möglichkeit der Unterdrückung der Toleranz durch Blockade des RES mit Thoriumdioxid	ja	nein
Art der Toleranz	spezifisch ⁺	unspezifisch
Freisetzung von endogenem Pyrogen	ja	ja
Vermutete zentrale (tiefe) Rezeptoren liegen:	im Hypothalamus	im Hypothalamus

⁺ Bei dieser Art der Toleranz ("Endotoxin-Immunität": Kim u. Watson, 1965) spielen offenbar immunologische Mechanismen ursächlich eine Rolle (Watson u. Kim, 1963). Zum Mechanismus der Endotoxin-Toleranz siehe auch bei Greisman u. Woodward (1965). Sie ist passiv übertragbar (siehe u.a. bei Shuman u. Petersdorf, 1965) und dabei an 19 S Antikörperfraktionen gebunden (Kim u. Watson, 1965).

4. Zum Wirkungsmechanismus viraler und bakterieller Pyrogene

Der Wirkungsmechanismus der verschiedenen Pyrogene ist noch nicht endgültig geklärt. Aus den Ergebnissen einer Reihe experimenteller Arbeiten zeichnet sich jedoch ein ungefähres Gesamtbild ab (siehe Abbildung 8).

Als besondere Befunde seien hier herausgestellt:

- a) die Beteiligung der Leukozytenlysosome an der Freisetzung von endogenem Pyrogen (Herion u. Mitarb., 1966),
- b) die genaueren Kenntnisse über die funktionelle Bedeutung der Leukozytenlysosome (Übersichten u.a. bei Merker, 1965; Policard, 1965; Thomas, 1965),
- c) neue Forschungsergebnisse über die funktionellen und metabolischen Eigenschaften der Leukozyten überhaupt,
- d) die Fortschritte bei der Reinigung, Konzentrierung und Charakterisierung des endogenen Pyrogens (Bennett u. Beeson, 1953a; Atkins u. Wood, 1955, 1955a; King u. Wood, 1958, 1958a; Atkins u. Huang, 1958, 1958a, 1958b; Petersdorf u. Bennett, 1959; Collins u. Wood, 1959; Gillman u. Mitarb., 1961 (Wood u. Mitarb., 1951; Cohn u. Morse, 1960, 1960a); Kaiser u. Wood, 1962, 1962a; Atkins u. Mitarb., 1964; Bornstein u. Mitarb., 1964; Snell u. Atkins, 1965; Fukuda u. Murata, 1965; Falk, 1966; Bodel u. Atkins, 1966; Hardley u. Mitarb., 1966; Bodel u. Atkins, 1966).

Nach diesen Untersuchungen wird das endogene Pyrogen wie folgt charakterisiert (Hardley u. Mitarb., 1966):

- a. seine Aktivität ist an ein Protein gebunden;
- b. die aktive Komponente ist durch Zellophan nicht dialysierbar;
- c. die aktive Komponente ist durch Phenol und Perchlorsäure präzipitierbar;
- d. die aktive Komponente ist durch Phenol extrahierbar und durch Proteolyse mit Pepsin oder Trypsin zerstörbar.

- e) Die Erkennung von Zusammenhängen zwischen Fieber, Interferonbildung und unspezifischer Infektionsabwehr. Es liegt eine größere Reihe von Experimenten an den verschiedensten Versuchstieren vor, aus der geschlossen werden kann, daß z.B. virusinfizierte Tiere bei niedriger Raum- bzw. Bebrütungstemperatur (= geringere Interferonproduktion) eine kleinere Überlebensrate aufweisen als diejenige Tiergruppe, die bei höheren Temperaturen (= großer Interferonspiegel) gehalten wird (siehe u.a. bei Ruiz-Gomez u. Sosa-Martinez, 1965; Ruiz-Gomez u. Isaacs, 1963; Lwoff, 1965; Postic u. Mitarb., 1966; Kirn u. Mitarb., 1966).
- f) Die Entdeckung und Charakterisierung interferonähnlicher Inhibitoren auch nach Endotoxingaben (Ho, 1964; Stinebring u. Youngner, 1964; Ho u. Mitarb., 1965; Ho u. Kono, 1965; Oh u. Gill, 1966; Ke u. Mitarb., 1966).

Eine schematische Darstellung der Wirkung von Viruspyrogenen hat Großgebauer (1967c) gegeben. In ihr sind zudem die wesentlichsten Charakteristika der Leukozytenlysosome, des endogenen Pyrogens und des Interferons aufgeführt (Abbildung 8).

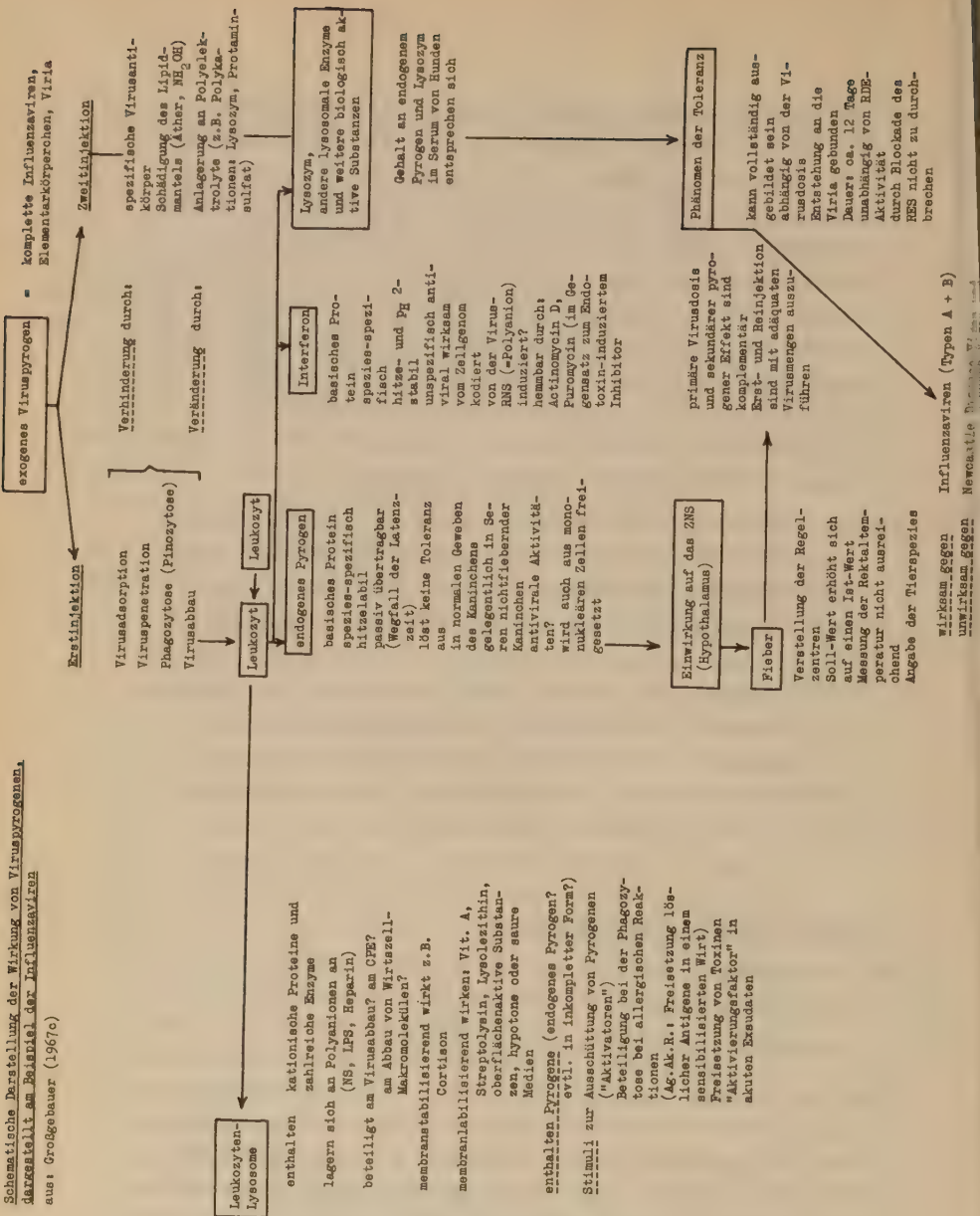
VI. Fragestellungen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende experimentelle Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Virusinaktivierungsstudien mit Hydroxylamin

Die bereits vorliegenden Studien über den Einfluß von Hydroxylamin auf die biologischen Wirkungen von Viren (Franklin u. Wecker, 1959; Schäfer u. Rott, 1962; Rott, 1962; Scholtissek, 1965; Großgebauer, 1965, 1966; Gendon, 1966; Mietens, 1966; Fellowes, 1966; Altstein u. Mitarb., 1966; Freese u. Mitarb., 1966) haben gezeigt, daß durch diese chemische Verbindung die Infektiosität verschiedener Virusarten rasch aufgehoben werden kann. Wesent-

Schematische Darstellung der Wirkung von Viruspyrogenen.
dargestellt am Beispiel der Influenzaviren
aus: Großgebauer (1967c)



lich war der Befund, daß trotz einer durchgreifenden Hydroxylamin-Behandlung der Influenzaviruspartikel deren antigene Eigenschaften unverändert erhalten bleiben (Schäfer u. Rott, 1962; Großgebauer, 1965). Somit stellte sich die Frage nach der Verwendung von Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviren als aktive Impfstoffe (Schäfer u. Rott, 1962).

Uns schien die Beantwortung der Frage dringlich, ob solche "Totimpfstoffe" im Tierversuch noch pyrogene und toxische Reaktionen auszulösen vermögen. Damit wäre ein Befund erarbeitet worden, der über die Verträglichkeit eines solchen Impfstoffes praktisch bedeutungsvolle Aussagen machen würde, zumal dieser z.Z. in den U.S.A. in Feldversuchen auf seine Wirksamkeit hin untersucht wird (Kongreßberichte, 1966).

Zugleich erhofften wir uns durch diese chemische Vorbehandlung der Influenzaviruspartikel Hinweise auf die Natur des exogenen Viruspyrogens.

Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen mußte angenommen werden, daß Hydroxylamin - neben möglichen anderen Virusbausteinen - vor allem die Virusnukleinsäure inaktiviert (Verlust der Infektiosität!). Der Beweis dafür, daß Hydroxylamin mit Nukleinsäurebausteinen (Cytosin und Uracil) reagiert, war schon früher erbracht worden (Schuster, 1961; Brown u. Schell, 1961 sowie Freese u. Mitarb., 1966).

Die Frage, ob neben der Virus-Ribonukleinsäure noch weitere Virusstrukturen durch Hydroxylamin inaktiviert werden (Lipide?), haben wir in Modellversuchen zu beantworten versucht (Einwirkung von Hydroxylamin auf bakterielle Lipopolysaccharide).

2. Der elektronenoptische Nachweis einer möglichen morphologischen Veränderung der Influenzaviren durch Einwirkung von Hydroxylamin

Unseres Wissens liegen bisher solche Untersuchungen nicht vor. Morphologische Veränderungen, z.B. Virusaufrühe o.ä. würden jedoch darauf hinweisen, daß Hydroxylamin-vorbehandelte Viren wesentliche biologische Eigenschaften verlieren.

3. Versuche zur Beeinflussung der pyrogenen Viruswirkung durch Lysozym

Über die Wechselwirkungen zwischen Viren und Polykationen, häufig Protaminsulfat oder DEAE-Dextran, ist verschiedentlich berichtet worden (siehe Übersicht von Großgebauer, 1967b). Auch zwischen Lysozym und Influenzaviren sind Interaktionen beobachtet worden. So konnte Großgebauer (1966a) in einem von ihm entwickelten Hämagglutinationstest nachweisen, daß sich die lysozymbedingte Hämagglutination durch normale und influenzavirusinfizierte Allantoisflüssigkeiten hemmen ließ. Auch das intakte Influenzavirus vermochte diese Hämagglutination zu hemmen, so daß angenommen werden kann, daß sich das Lysozym an die sog. Normalkomponente des Virus anlagert (K. Großgebauer, persönliche Mitteilung vom 1.7.1966-1966c).

Unsere Untersuchungen verfolgten den Zweck, den sich bildenden Influenzavirus-Lysozymkomplex auf seine pyrogene Aktivität hin zu untersuchen. Wir erwarteten einen Einfluß des polykationischen Lysozyms auf die pyrogene Viruswirkung, da zu vermuten war, daß dieser Komplex leichter und rascher in die das endogene Pyrogen freisetzenden Leukozyten eindringt.

4. Versuche zur Frage der Pyrogenität des Poliomyelitisvirus

Poliomyelitisviren gehören zu den apyrogenen Viren (u.a. Siegert u. Mitarb., 1963).

Trotz dieser Befunde stellten wir uns die Aufgabe, zu prüfen, ob nicht doch hohe Dosen ungereinigter oder z.B. phenolbehandelter Poliomyelitisviren (und damit die Virus-RNS) die Fähigkeit besitzen, im Kaninchen Fieberreaktionen hervorzurufen.

Die Frage der Pyrogenität von Virusnukleinsäuren ist noch nicht abgeklärt. Slifkin u. Isacson (1965) teilten mit, daß einige Fraktionen von Parainfluenzaviren nach der Phenolextraktion im Kaninchen Fieber induzierten. Freilich war das Tiermaterial der Autoren zu klein, um bindende Rückschlüsse zuzulassen; zudem konnte die Anwesenheit von Spuren anderer Virusbausteine nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Fieberwirkung von Nukleinsäure, und zwar die von Heferibonukleinsäure, ist schon verschiedentlich beschrieben worden (Chiosa u. Mitarb., 1960, 1966; Dressel u. Jacker, 1966). Heferibonukleinsäure ist sogar von diesen Autoren als Pyrogenstandard, also zur Selektion ungeeigneter Kaninchen, empfohlen worden. Interessanterweise ist zur Zeit noch nicht sichergestellt, ob die Hefe-RNS überhaupt pyrogen ist. Es ist denkbar, daß ihre pyrogene Wirkung auf eine obligate Verunreinigung mit bakteriellen Pyrogenen zurückzuführen ist (O. Westphal, zit. nach Dressel u. Jacker, 1966).

Zur Erweiterung der bisherigen Kenntnisse über die Fieberwirkung der Hefe-Ribonukleinsäure sollten die folgenden experimentellen Untersuchungen dienen.

5. Versuche zur Beeinflussung der Pyrogenität von Hefe-RNS durch das polykationische Lysozym bzw. durch Hydroxylamin

Es sollte geprüft werden,

- a) in wieweit die Pyrogenität der Hefe-RNS an den polyanionischen Charakter dieser Bindung geknüpft ist
und
b) welche pyrogene Grenzdosis der verwendeten Hefe-RNS zugeordnet werden kann.

Die Versuche verfolgten schließlich den Zweck, weitere Erfahrungen über die Verwendung von Hefe-RNS als Pyrogenstandard zu sammeln.

Im Zusammenhang mit der Reinigung von Influenzaviruspräparationen, z.B. durch den Vorgang der Erythrozyten-Adsorption-Elution, ergab sich u.a. folgendes für unsere Pyrogenversuche praktisch wichtige Problem:

6. Prüfung der Möglichkeit, ob Influenzaviren während einer längeren Inkubationszeit von Erythrozytenmembranen pyrogene Stoffe abzuspalten vermögen

Aufdeckung einer Fehlerquelle beim Arbeiten mit Erythrozyten als Virusadsorbens

7. Registrierung der toleranzausbildenden Aktivität der unvorbehandelten und vorbehandelten Influenzaviruspräparationen sowie der Hefe-RNS-Lösung

Die Faktoren, die zur Ausbildung einer Virustoleranz führen, sind noch unbekannt. Daher schienen uns diese Untersuchungen geeignet, Zusammenhänge zwischen der Virusvorbehandlung mit Hydroxylamin und dem Toleranzmechanismus zu suchen.

8. Zur Fieberwirkung von Kaninchenserum; zugleich eine verbesserte Methode der Übertragung von Serum fiebernder Tiere

Bei eigenen Versuchen, das endogene Pyrogen passiv von einem Kaninchen auf das andere zu übertragen, stellten wir in Übereinstimmung mit Literaturbefunden fest, daß nur die Übertragung größerer Serummengen den Nachweis eines zirkulierenden Pyrogens erbringen kann.

Im Laufe dieser Untersuchungen verbesserten wir die Methode der passiven Übertragung von endogenem Pyrogen, so daß auf sie gesondert eingegangen werden soll.

9. Kontrolluntersuchungen zur Absicherung der Empfindlichkeit und der Spezifität des Pyrogentestes

In diesen Versuchen waren normale und virusinfizierte Allantoisflüssigkeiten (ungereinigt und gereinigt) sowie interferonreiche Viruspräparationen, Lysozym-, Natriumnitrit- und Endotoxinlösungen sowie Staphylokokkensuspensionen in den Pyrogentest zu nehmen, um die positiven Befunde zu kontrollieren.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Material und Methoden

1. Durchführung des Pyrogentestes (Kaninchen-Versuche)
(Die Methodik ist unter A. IV. 1. und 2. beschrieben worden).

Die Kaninchen gehörten keiner einheitlichen Rasse an. Sie waren äußerlich gesund und wogen zwischen 2 und 3 Kilogramm.

24 Stunden vor jedem Versuch hielten wir die Tiere mindestens 4 Stunden zur Gewöhnung an die Haltung und Umgebung und zur Messung der Normaltemperaturen in den Versuchskäfigen. Am folgenden Tag wurden vor der Injektion des Versuchsmaterials nochmals 2 bis 3 Stunden die Temperaturen gemessen, um einen konstanten Ausgangswert zu erhalten.

Der Versuchsraum war ruhig, die Raumtemperatur wurde auf 20°C konstant gehalten.

Die Tiere wurden mit Hafer, Kartoffeln in Weizenkleie, Kohl, u.a. Grünfutter sowie Heu ernährt.

Meßgerät: "Raumsparende Ein- oder Mehrfarbenpunktschreiber" der Fa. Hartmann & Braun AG, Frankfurt a. Main.

Die Messungen erfolgten kontinuierlich über einen Zeitraum von 6 Stunden mit Widerstandsthermometern, die an das Meßgerät mit Kreuzspulmeßwerken (Ohmmeter) angeschlossen waren.

Die Ergebnisse wurden mit einem eingebauten Schreibgerät auf die Papierrolle mit Aufwickelvorrichtung aufgetragen.

Sterilisation der Glasgeräte: Im Heißluftsterilisator, 2 Stunden bei 240°C.

2. Virusmaterial

Es wurden folgende Virusarten bzw. -typen herangezogen:
Influenzavirus A₂/Sing/1/57, Newcastle Disease-Virus
und Poliomyelitisvirus Typ I Mahoney.

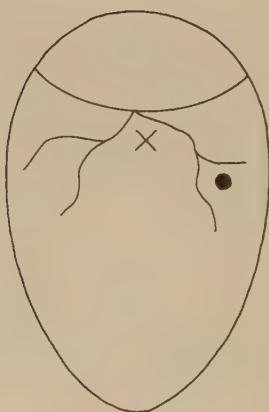
a) Virusgewinnung

a.1) Gewinnung der myxovirus-infizierten Allantoisflüssigkeiten

Frische, saubere Eier von Leghornhühnern wurden 9 bis 10 Tage lang in horizontaler Lage bei 37,5°C und einer Luftfeuchte von ca. 60% vorbebrütet. Danach sonderten wir die unbefruchteten Eier über einem Durchleuchtungskasten aus und markierten auf der Kalkschale der befruchteten Eier die Luftblase und eine gefäßfreie Stelle zur anschließenden Injektion des Virusmaterials in die Allantoishöhle (siehe Abbildung 9). Nach chemischer Desinfektion der Injektionsstelle (Abreiben mit 80%igem Äthylalkohol) wurde die Kalkschale durchbohrt und das Virusmaterial (100 ID₅₀-Einheiten) mittels einer 1 ml-Spritze in die Allantoishöhle injiziert. Anschließend wurde die Öffnung mit Zaponlack überstrichen und der Ansatz in der Regel weitere 48 Stunden bei 37°C nachbebrütet. Zur Vermeidung von stärkeren Gefäßblutungen beließen wir die Eier 2 Stunden bei -20°C in einer Kühltruhe. Dann wurde nach chemischer Desinfektion die Kalkschale über der Luftblase entfernt, vorsichtig die Kalkhaut abgezogen und mittels einer Rekord-spritze die virusinfizierte Allantoisflüssigkeit aufgezogen.

Abbildung 9

Schematische Darstellung eines 9-Tage vorbebrüteten
Hühnereies



Erläuterungen zur Abbildung 9:

Über einem Durchleuchtungskasten wurden mit einem Bleistift die Luftblase, das Embryonenauge (●) und eine gefäßfreie Stelle zur anschließenden Injektion des Virusmaterials (X) aufgezeichnet.

a.2) Gewinnung der poliomyelitisvirus-infizierten Gewebekultursuspension

Diese Präparation verdanken wir der Freundlichkeit der Herren Priv.-Dozenten Dr. K.O. Habermehl und Dr. W. Diefenthal (Virusabteilung des Städt. Wenckebach-Krankenhauses Berlin). Es handelt sich um Poliomyelitisviren vom Typ I (Mahoney), die auf HEp 2-Kulturen propagiert worden waren (Eagle Medium ohne Serumzusätze). Der Infektionstiter lag bei $1,5 \times 10^8$ PFU (plaque-forming units = plaque-bildende Einheiten) je Milliliter.

b) Bestimmung des Hämagglutinationstiters

Die frisch geernteten myxovirusinfizierten Allantoisflüssigkeiten wurden in einer phosphatgepufferten isotonischen Kochsalzlösung (p_H 7,4) mit dem Faktor 2 austitriert und gleiche Mengen einer ca. 1%igen Suspension von nativen Hühnererythrozyten zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei $+4^\circ C$ im Kühlschrank belassen und abgelesen: Es wurden nur Virussuspensionen in den Versuch genommen, die mindestens 1000 hämagglutinierende Einheiten enthielten.

c) Bestimmung der ID_{50} ,

d.h. derjenigen Infektionsdosis, die gerade noch 50% der embryonierten Eier infiziert:

Frisch geerntete myxovirusinfizierte Allantoisflüssigkeiten wurden in einer gewöhnlichen bakteriologischen Nährbouillon mit dem Faktor 10 bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} titriert. 0,2 ml jeder Virusverdünnung verimpften wir auf je zehn 9-Tage vorbebrütete Eier, bebrüteten die Ansätze 48 Stunden bei $37^\circ C$ und überprüften mit dem Virushämagglutinationstest, bei welchem Ansatz noch 50% der Eier infiziert werden konnten. Die Berechnung dieser ID_{50} erfolgte nach Reed und Muench (1938). Sie lag beim Influenzavirus A₂/Sing./1/57 bei 10^{-9} , beim Newcastle Disease-Virus bei $10^{-7,5}$.

3. Virusanreicherungsverfahren

a) Erythrozyten-Adsorptions-Elutionsverfahren

Frisch geerntete virusinfizierte Allantoisflüssigkeiten wurden mit nativen Hühnererythrozyten, der Ansatz niedrigtourig (Sediment einer Suspension der Erythrozyten in phosphatgepuffelter, physiologischer Kochsalzlösung) gemischt und zur Adsorption der Viruspartikel an die Erythrozytenoberfläche 1 Stunde bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank unter wiederholtem Schütteln aufbewahrt. Danach wurde der Ansatz niedrigtourig zentrifugiert (5 Min. bei 3000 Upm), der Überstand verworfen und auf das Sediment ein Drittel des Ausgangsvolumens einer auf 37°C vorgewärmten phosphatgepufferten isotonischen Kochsalzlösung (p_{H} 7,4) gegeben. Nach der Elution der Viruspartikel (im Brutschrank bei 37°C während 2 Stunden) wurde der Ansatz erneut niedrigtourig zentrifugiert. Der Überstand enthielt gereinigte und hochtitrige Viruselementarkörperchen.

b) Ultrazentrifugation

Ultrazentrifuge: OMEGA II der Firma Christ, Osterode.

Technik:

Verwendet wurden Röhrchen aus V2A-Material und der Winkelrotor 9797 aus Titan.

Dauer der Zentrifugation: 2 Stunden bei 100 000 g.

Das Virussediment wurde in einer phosphatgepufferten isotonischen Kochsalzlösung (p_{H} 7,4) aufgenommen und mit einem Glasstab manuell homogenisiert.

4. Virusvorbehandlung mit

- a) Hydroxylamin (NH_2OH): Hydroxylaminhydrochlorid sulfatfrei, puriss., p.a., Fluka AG, Buchs SG.

Die Vorbehandlung ungereinigter und gereinigter Influenzaviruspräparationen mit NH_2OH erfolgte nach Angaben von Schäfer u. Rott (1962):

Zu einer 4 mol. NH_2OH -Lösung wurde die gleiche Menge einer 14%igen NaOH -Lösung gegeben. Nach Mischen erfolgte die Zugabe von Virusmaterial im Verhältnis 1:1, so daß das Hydroxylamin 1 mol. vorlag. Die Virus- NH_2OH -Mischung (p_{H} 7,0) wurde 1, 2, 3 und 4 Tage lang bei 20°C oder bei 37°C stehen gelassen. Dann wurde der Ansatz (z.B. 30 ml) ausgiebig bei +4°C gegen eine phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung dialysiert (5-stündige Vordialyse gegen 5 Liter einer phosphatgepufferten, isotonischen Kochsalzlösung, Hauptdialyse über Nacht gegen 12 Liter des gleichen Puffers, 3-stündige Nachdialyse gegen 3 Liter des Puffers).

Die Lösungen von bakteriellen Lipopolysacchariden und Hefe-RNS wurden in gleicher Weise vorbehandelt (siehe unter B. I. 8. und 10.).

- b) Natriumnitrit (NaNO_2): Natriumnitrit krist., p.a., E. Merck, Darmstadt.

Die Nitritbehandlung der Influenzaviren und des bakteriellen Lipopolysaccharids (siehe unter B. I. 8.) erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Dress (1964):

20 ml des Versuchsmaterials wurden mit Natriumacetat-Puffer (p_{H} 4,6) und NaNO_2 -Lösung im Verhältnis 10:5:1 gemischt. Die Endkonzentration des Acetatpuffers betrug 0,025 mol., die der NaNO_2 -Lösung 0,1 mol. Nach 2 und 4 Tagen Inkubationszeit bei 37°C wurde das Gemisch gegen eine phosphatgepufferte isotonische Koch-

salzlösung (p_H 7,4) ausgiebig dialysiert (siehe unter B. I. 4. a).

- c) Hitze: Virusallantoisflüssigkeiten wurden zu diesem Zwecke im Wasserbad 1 Stunde bei $56^{\circ}C$ gehalten.
- d) Diäthyläther: Äther puriss. pro narcosi "Hoechst",
DAB 6, Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main.

Die influenzavirusinfizierten Allantoisflüssigkeiten wurden mit der doppelten Menge des Äthers versetzt und 2 Stunden bei $4^{\circ}C$ maschinell geschüttelt. Dann wurde der Ansatz zentrifugiert (5 Min. bei 3500 Upm) und der Überstand verworfen. Die in der flüssigen Phase verbleibenden Ätherreste ließen wir bei Zimmertemperatur in einer keimarmen Impfkapselle verdunsten.

Es wurden nur Präparationen in die Versuche genommen, die bei Verwendung von Erythrozyten des Meerschweinchens im Hämagglutinationstest einen Titeranstieg von wenigstens 4 Stufen aufwiesen.

Außer den Viruspräparationen wurde auch bakterielles Lipopolysaccharid in gleicher Weise vorbehandelt (siehe unter B. I. 8.).

- e) Phenol: Phenol p.a., E. Merck, Darmstadt.

Poliomyelitisviruspräparationen (siehe unter B. I. 2. a2) wurden mit der dreifachen Menge einer 80%igen (= wässrigen) Phenollösung gemischt und 15 bis 20 Minuten lang kräftig geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (5 Min. bei 3500 Upm) und die Phenolphase verworfen. Die wässrige Phase wurde noch zweimal in der gleichen Weise mit Phenol behandelt. Phenolreste entfernten wir durch dreimaliges Ausschütteln (jeweils 10 Minuten) mit der zehnfachen Menge Diäthyläther.

f) Polykationen

Lysozym: Lysozym 3x krist. reinst, Serva Entwicklungs-labor Heidelberg.

Protaminsulfat: Protaminsulfat reinst (Salmin vom Lachs), Serva Entwicklungs-labor Heidelberg.

Die Polykationen wurden unter sterilen Kautelen eingewogen und den Myxoviruspräparationen (und den Staphylokokkensuspensionen, den Hefe-RNS-Lösungen, den Normalallantoisflüssigkeiten sowie der physiologischen Kochsalzlösung) zumeist in einer Endkonzentration von 0,3% zugesetzt.

5. Gewinnung von interferonreichen Myxovirus-Allantoisflüssigkeiten

Hierzu wurde 10 Tage bei 37°C vorbebrüteten Hühnereiern jeweils 1,0 ml einer hochtitrigen hitzeinaktivierten (1 Stunde bei 56°C) Virussuspension in die Allantoishöhle injiziert. Die Ernte der Allantoisflüssigkeiten erfolgte nach einer weiteren Bebrütung der Eier von 48 Stunden bei 37°C.

Vor dem Kaninchenversuch wurden die eingespritzten Virus-hämagglutinine an Hühnererythrozyten adsorbiert und durch Zentrifugation entfernt.

6. Fiebertoleranzversuche mit Influenzaviren

Zur Beurteilung, ob eine Viruspräparation noch die Fähigkeit zur Ausbildung einer Fiebertoleranz besitzt (siehe unter A. III.), wurde den Versuchskaninchen 24 Stunden nach der Erstinjektion eine homologe hochtitrige Virussuspension gleichfalls intravenös appliziert.

Solche Toleranzversuche wurden auch mit Hefe-RNS-Lösungen durchgeführt. Die Zweitinjektion nach 24 Stunden erfolgte hier ebenfalls mit dem homologen Material, d.h. mit der pyrogenen Hefe-RNS-Lösung.

7. Tierversuche zur Übertragung des endogenen, leukozytären Pyrogens

Methodische Hinweise für die Versuchsdurchführung finden sich in Tabelle VIII.

Grundsätzlich wurde den Kontrolltieren und den Versuchstieren aus der Halsschlagader ca. 50 ml Blut entnommen, das ohne Zusatz eines Antikoagulans sofort zentrifugiert wurde (20 Min. bei 4000 Upm). Von dem gewonnenen Serum wurden weiteren Versuchskaninchen jeweils ca. 20 ml intravenös appliziert. Die Temperaturen der Tiere wurden wie üblich rektal gemessen (siehe unter A. IV).

8. Bakteriellcs Endotoxin: Bacto Lipopolysaccharide
E. coli 026:B6, Difco Laboratories
Detroit 1, Mich., USA.

a) Endotoxinnachweis im embryonierten Hühnerei
("i.v.-Technik")

Die Methodik ist ausführlich bei Großgebauer u. Langmaack (1967) beschrieben:

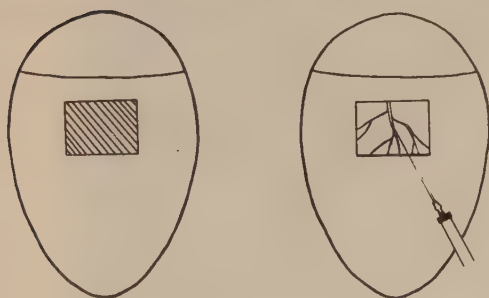
13 Tage bei 37°C vorbebrüteten Hühnereiern wurde über einem gut sichtbaren Blutgefäß die Kalkschale entfernt; auf die Kalkhaut wurde ein Tropfen Immersionsöl (E. Merck, Darmstadt) gegeben. Dadurch verhärtete sich die Kalkhaut und das Gefäß wurde fixiert. Mit einer feinen Injektionsnadel (übliche Nadel, dünner als Nr. 20) wurde etwa 0,25 ml des Untersuchungsmaterials (bakterielles Lipopolysaccharid, Myxovirusmaterial und Normalallantoisflüssigkeit) in Richtung des Blutstromes injiziert. Die Nadel wurde nach der Injektion nicht herausgezogen. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C entfernten wir die Nadel aus dem Gefäß und spülten sie kurz durch.

b) Endotoxinnachweis im Kaninchentest ("Pyrogentest")

Durchführung der Versuche siehe unter A. IV. 1. und 2. und B. I. 1.

Abbildung 10

Schematische Darstellung eines
13-Tage vorbebrüteten Hühnereies



Erläuterungen zur Abbildung 10:

links: Embryoniertes Ei nach der Entfernung eines Bezirks der Kalkschale.

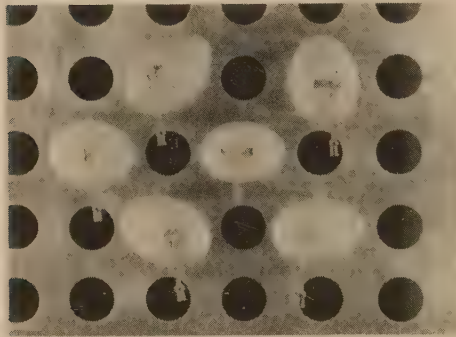
rechts: dasselbe Ei nach Auftropfen von Immersionsöl auf die Kalkhaut: Es stellen sich die Gefäße gut dar.

Die Einführung der Injektionsnadel ist angedeutet.

Die weitere Technik siehe Abbildung 11.

Abbildung 11

13-Tage vorbebrütete Hühnereier nach
erfolgter intravenöser Zufuhr des
Untersuchungsmaterials



Erläuterungen zur Abbildung 11:

Es ist ersichtlich, daß jede Injektionsnadel in der embryonalen Vene belassen wird. Die Nadeln bleiben während der gesamten Nachbebrütungszeit in den Gefäßen.

9. Staphylokokken

Die Bakterien (*Staphylococcus aureus* SG 511, Berlin) wurden auf normalem Nähragar gezüchtet. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C schwemmten wir die Keime mit einer physiologischen Kochsalzlösung ab und zählten die Bakterien im Plattengußverfahren. Es wurden Suspensionen in den Versuch genommen, deren Keimzahl zwischen 10^8 und 10^{11} /10 ml betrug.

10. Hefe-Ribonukleinsäuren: Natriumnucleinat aus Hefe

Erg. B. 6

E. Merck AG, Darmstadt,

sowie Ribonucleinsäure, hochmolekular,
p.a., Lyophil., $S_{20} \sim 8,0$ aus Hefe,
Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

Die hochmolekulare Hefe-RNS wurde mit 95%igem Äthylalkohol präzipitiert und in dreifach destilliertem Wasser wieder gelöst. In steigenden Konzentrationen wurden diese Hefe-RNS-Präparationen in physiologischer pyrogenfreier Kochsalzlösung aufgenommen. Solche Lösungen prüften wir mit und ohne Lysozymzusatz (0,3% Endkonzentration) sowie nach Hydroxylamin-Vorbehandlung in Kaninchenversuchen auf ihre Pyrogenität.

Die Durchführung der Fiebertoleranzversuche siehe unter B. I. 6.

11. Elektronenmikroskopische Studien an normalen und Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviren

Die Influenzaviruspartikel (Stamm: A_2 /Sing./1/57), durch den Vorgang der Erythrozyten-Adsorption-Elution gereinigt und in destilliertes Wasser aufgenommen, wurden auf elektronischen Kupferblendnetzen aufgebracht, die mit Formvar (Kunststoffolie) belegt waren. Diese Blenden wurden

entweder mit Palladium unter einem Winkel von 20° schräg bedampft und mit 1%igem Uranylacetat positiv oder mit 2%iger Phosphorwolframsäurelösung (p_H 3 und p_H 6) negativ gefärbt.

Die Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Eliskop I bei einer Strahlspannung von 80 kV durchgeführt.

Die Vorbehandlung der Viren erfolgte mit einer 1-molaren Hydroxylamin-Lösung 4 Tage bei 37°C (siehe unter B. I.4a).

II. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Versuche in 15 Tabellen und 12 Abbildungen vorgelegt.

Ergebnisse der Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit Myxoviruspräparationen
(Ohne physikalische und chemische Vorbehandlung der Viruspartikel)

- 39 -

Versuchsmaterial:	Pyrogennachweis		am		Toxizitätsnachweis		
	K a n i n e n (intravenöse Applikation)		Hühnerembryo (i.v. Appl.)		Saugmaus (intracerebr. Appl.)		
	Gesamtzahl der Tiere	Zahl d. Tiere mit Tempera- turerhöhung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Gesamtz. der Tiere	davon abge- storben	Gesamtz. der Tiere	davon abge- storben
Normale Allantoisflüssigkeit (N-AF)	3	0		9	0	n.d.	
Virusinfizierte Allantoisflüssigkeit (Vi-AF)							
1) Influenzavirus (Stamm: A ₂ /Sing./1/57) HAE: 20 000	50'	50	30-110	163	147	55	1
2) Newcastle Disease-Virus (NDV) HAE: 1 280	9	9	50-120	n.d.		n.d.	
Mit Erythrocyten adsorbierte Vi-AF	18	0		n.d.		n.d.	
Interferonreiche virusfreie AF	10	0		n.d.		n.d.	
N-AF + Lysozym 0,3% (E.K.)	3,	0		n.d.		n.d.	
Lysozym 0,3% (E.K.)	14	0		n.d.		n.d.	
Protaminsulfat 0,3% (E.K.)	9	0		n.d.		n.d.	
EDTA 0,03% (E.K.)	3	0		n.d.		n.d.	
NaNO ₂ 0,1 molar (E.K.)	3	0		n.d.		n.d.	
Blutreiche AF (Hühnerembryoblut)	1	0		n.d.		n.d.	

Erklärungen: n.d. = nicht durchgeführt

HAE = Hämagglutinin

E.K. = Endkonzentration

Erläuterungen zur Tabelle I

Die Ergebnisse der Versuche, die in dieser Tabelle zusammengefaßt wurden, sollen Aussagen über die Reproduzierbarkeit unseres Testsystems (Tiere, Meßgerät, Untersuchungsmaterialien, die als Kontrolle mitgeführt werden müssen) machen.

Ganz allgemein ist festzustellen, daß die Virussuspensionen die in der Literatur beschriebenen pyrogenen Aktivitäten zeigten, und daß die für unsere Versuche erforderlichen Kontrollmaterialien in diesen Konzentrationen allein keine Fieberwirkungen hervorrufen.

Für die später folgenden Versuche mit dem virusinaktivierenden Hydroxylamin interessierte zudem die Toxizität der unvorbehandelten Influenzaviren, so daß auch diese (Kontroll)-Versuche in diese Tabelle aufgenommen wurden.

Aus der Tabelle ist im einzelnen ersichtlich:

1. Hochtitrige Influenzavirus- und Newcastle Disease-Viruspräparationen sind im Kaninchentest stark pyrogen.
2. Von den Membranen der getesteten Huhn- und Menschenerythrozyten lösen sich durch die Einwirkung von Influenzaviren keine pyrogenen Substanzen ab, selbst dann nicht, wenn das Virus-Erythrozytengemisch (20 ml Virus-Allantoisflüssigkeit 1:1000, 7-9-malige Adsorption mit je 4-6 ml Erythrozytensediment) bis zu 4 Stunden bzw. über Nacht bei +4°C oder +37°C inkubiert wurde. Injizierte, mit Erythrozyten adsorbierte (virusfreie) Allantoisflüssigkeit: 5 bis 14 ml pro Tier.
3. Blutarme und blutreiche Normalallantoisflüssigkeiten 9-Tage vorbebrüteter Hühnereier (Injektionsmenge 10 ml pro Tier) sowie Normalallantoisflüssigkeiten, denen Lysozym zugesetzt worden war (Injektionsmenge: 10 ml pro Tier), erwiesen sich als nicht pyrogen.
4. Interferonreichen Allantoisflüssigkeiten (Gewinnung siehe unter B. I. 5.), d.h. Präparationen, die virusfrei,

aber reich an unspezifisch antiviral wirkenden Faktoren waren, konnte keine Fieberwirkung zugeordnet werden.
Injektionsmenge: bis zu 18 ml pro Tier.

5. Lysozym, Protaminsulfat, EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) und Natriumnitrit, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, waren in den angegebenen Konzentrationen pyrogenfrei. Präparationstechnik siehe unter B. I. 4.
6. Influenzavirusinfizierte Allantoisflüssigkeiten erwiesen sich im Hühnerembryo ("i.v.-Technik") (siehe unter B. I. 8a), jedoch nicht in der Saugmaus (intrazerebrale Injektion von 0,1 ml, Beobachtungszeit: 24 Stunden), als toxisch.

Die Hühnerembryonen starben nach Einspritzung hochtitriger Viruspräparationen (z.B. 0,25 ml 1:1000) nach ca. 12 Stunden ab. An den Embryonen zeigten sich petechiale Blutungen und häufig zerebrale Mazerationen (siehe auch Abbildungen 13 u. 15). Insbesondere waren die Eihäute und der Embryonenkopf befallen.

Abbildungen 12 und 13

Toxische Veränderungen am Kopf eines Hühnerembryos nach intravenöser Applikation von kompletten Influenzaviren

Abbildung 12

Normales Aussehen eines embryonalen Hühnerkopfes nach 14-tägiger Bebrütung des Keimes (ungespritzt)

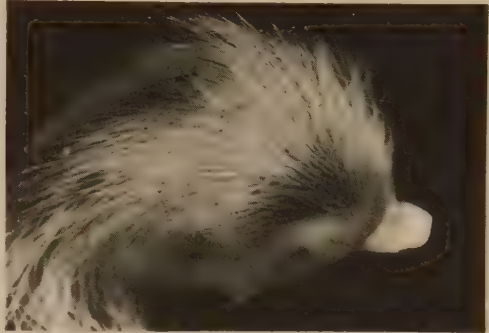


Abbildung 13

Toxische Veränderungen am Kopf nach Applikation von kompletten Influenzaviren



Erläuterungen zu den Abbildungen 12 und 13:

Häufig zeigten sich nach der intravenösen Zufuhr von kompletten Influenzaviren (bzw. auch nach Applikation von bakteriellem Endotoxin) toxische Veränderungen an den Chorioallantoismembranen, am Embryokopf (petechiale Blutungen, Hirnödem, blutreiche Hirnsubstanz) sowie am Körper der Embryonen.

Abbildungen 14 und 15

Toxische Veränderungen am Hühnerembryo nach intravenöser
Applikation von kompletten Influenzaviren

Abbildung 14

Normales Aussehen
eines 14-Tage vor-
bebrüteten Hühner-
embryos (unge-
spritzt)

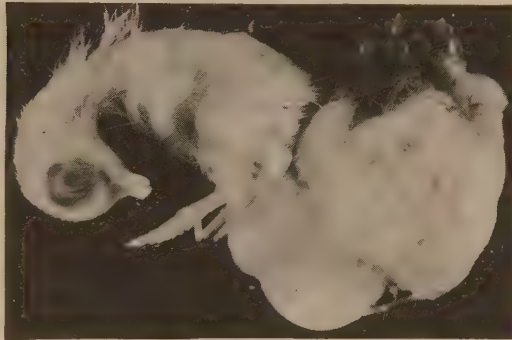
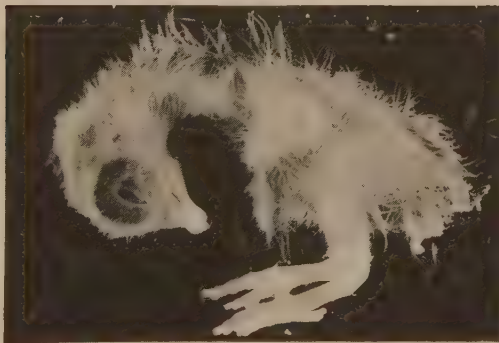


Abbildung 15

Toxische Verän-
derungen an ei-
nem Embryo nach
dem Versuch



Erläuterungen zu den Abbildungen 14 und 15:

Im allgemeinen wies die Kopfpartie die stärksten toxi-
schen Veränderungen auf (siehe Abbildung 13). Aber auch
der übrige Körper war mit petechialen Blutungen übersät.

TABELLE II

Ergebnisse der Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit Influenzaviruspräparationen
(Mit physikalischer bzw. chemischer Vorbehandlung der Viruspartikel, ausgenommen
die Inaktivierungsversuche mit Hydroxylamin)

Versuchsmaterial:	Pyrogennachweis am K a n i n c h e n (intravenöse Applikation)			Toxizitätsnachweis am H ü n e r e m b r y o (intravenöse Applikation)	
	Gesamtzahl der Tiere	Zahl d. Tiere mit Tempera- turerhöhung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Gesamtzahl der Tiere	davon abge- storben
Durch Influenzavirus (Stamm: A ₂ /Sing./1/57) infizierte Allantoisflüssigkeit	6	6	45-85	62	57
Virusvorbehandlung mit:					
Hitze 56°C/1 Std.	3	0		n.d.	
NaNO ₂ 0,1 molar (E.K.) 4 Tage bei 20°C	9	0		26	6
Diäthyläther (4°C/2 Std. geschüttelt) 1) ohne Lysozym	9	3	20-85	n.d.	
2) mit Lysozym 0,3% (E.K.)	1	1	35	n.d.	
Phenol nach vorangegangenen Virusauf- schluß durch Diäthyläther					

Erklärungen: n.d. = nicht durchgeführt
E.K. = Endkonzentration

Erläuterungen zur Tabelle II

Die Ergebnisse der Versuche, durch physikalische und chemische Vorbehandlung der Influenzaviren deren Fieberwirkung zu beeinflussen, sind in dieser Tabelle zusammengestellt worden.

1. Zunächst haben wir die Ergebnisse von Siegert und Braune (1964, 1964a) bestätigt, die nach Einwirkung von Diäthyläther auf Influenzaviren die Fieberwirkung zerstören konnten. In unseren Versuchen waren selbst noch 50 ml einer äthergespaltenen Viruspräparation (Hämagglutinationstiter: 1:4000) apyrogen. Temperaturerhöhungen von 2 Versuchskaninchen: $0,20^{\circ}\text{C}$ und $0,75^{\circ}\text{C}$.

Zusätze von Lysozym zu den ätherdestruierten Viren führten in der Mehrzahl der Fälle (6 Tiere) zu Schwankungen der Rektaltemperaturen, die unter $0,5^{\circ}\text{C}$ bezogen auf die Ausgangstemperatur lagen. 3 Tiere zeigten geringe Temperatursteigerungen über $0,5^{\circ}\text{C}$: nämlich $0,55^{\circ}\text{C}$, $0,65^{\circ}\text{C}$ bzw. $0,73^{\circ}\text{C}$.

Im Vergleich zu den unvorbehandelten Virussuspensionen war die virustoxische Wirkung der äthergespaltenen, nichtpyrogenen Viruspräparation stark vermindert.

2. Die Versuche, den Einfluß von Phenol bzw. Natriumnitrit (Technik siehe unter B. I. 4.) auf die pyrogene Viruswirkung zu studieren, müssen als orientierend bezeichnet werden (zu geringes Tiermaterial). Allerdings fielen die Experimente mit Natriumnitrit (3 Versuchstiere) eindeutig aus: Nach Applikation von 10 ml des Versuchsmaterials pro Tier konnten keine pyrogenen Temperatursteigerungen gemessen werden.

Die phenolextrahierten Viruspräparationen (Injektionsmenge: 4,0 ml) führten zu einer Temperaturerhöhung von $0,9^{\circ}\text{C}$. Zur Absicherung der Befunde sind jedoch Versuche mit einer größeren Anzahl von Tieren erforderlich, die von uns aus äußeren Gründen bisher noch nicht durchgeführt werden konnten.

TABELLE III

Ergebnisse der Progenitäts- und Toxizitätsversuche mit Influenzaviruspräparationen
Inaktivierungsstudien mit Hydroxylamin (NH_2OH)

Versuchsmaterial:	Pyrogennachweis am K a n i n c h e n (intravenöse Applikation)	Toxizitätsnachweis am Hühnerembryo (i.v. Appl.)				Gesamtz. der Tiere abge- storben	Gesamtz. der Tiere abge- storben
		Gesamtzahl der Tiere	Zahl d. Tiere mit Tempera- turerhöhung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Gesamtz. der Tiere abge- storben		
A. Durch Influenzavirus (Stamm: A./Sing./1/57) infizierte Allantoisflüssigkeit	Virusvorbehandlung mit NH ₂ OH 1 mol (E.K.)						
	I Einwirkungszeit d. NH ₂ OH: 1 Tag bei 37°C	3	3	45-80	n.d.	n.d.	davon abge- storben
	2 Tage "	3	0		n.d.	n.d.	
	3 Tage "	3	0		n.d.	n.d.	
	4 Tage "	15	0		18	1	
II Einwirkungszeit d. NH ₂ OH: 6 Std. bei 20°C		3	3	50-75	n.d.	n.d.	
	1 Tag "	3	3		n.d.	n.d.	
	4 Tage "	6	0		38	0	5
		3	3	80-90	n.d.	n.d.	
B. Durch Ultrazentrifugation (75 000 g/2 Std.) gewonnene Viruspartikel Virusvorbehandlung mit NH ₂ OH: 1 mol (E.K.)							
	Einwirkungszeit d. NH ₂ OH: 4 Tage bei 20°C	6	0		10	0	13

Erklärungen: n.d. = nicht durchgeführt
E.K. = Endkonzentration.

1) = aufgenommen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,3)

Erläuterungen zur Tabelle III

Diese Tabelle faßt die Ergebnisse der Versuche zusammen, die den Einfluß von Hydroxylamin auf die pyrogene Wirkung von Influenzaviren zeigen.

Es ist aus ihr folgendes ersichtlich:

1. Ungereinigte und durch Ultrazentrifugation gereinigte Virussuspensionen sind nach 48-stündiger und längerer Einwirkungszeit von Hydroxylamin apyrogen. (Geprüft an 33 Tieren, injizierte Menge: 5 bis 7 ml pro Tier, Häm-agglutinationstiter: 1:1000 bis 1:2000). Beim Variieren der Inaktivierungstemperaturen hat sich gezeigt, daß nicht nur bei 37°C, sondern auch bei 20°C eine Inaktivierung der Pyrogenität zu erreichen ist. Inkubiert man das Virus-NH₂OH-Gemisch allerdings bei +4°C, so rufen selbst nach 4 Tagen NH₂OH-Einwirkung die Virusansätze noch Fieber hervor.
2. Im Hühnerembryonen-Test ("i.v.-Technik", 0,25 ml, Häm-agglutinationstiter: 1:2000 pro Embryo) erwiesen sich die 4-Tage bei 20°C bzw. 37°C mit 1-mol. NH₂OH inkubierten Virusansätze als nicht mehr toxisch. Kürzere Einwirkungszeiten wurden nicht geprüft, so daß diese Zeitangabe kein Grenzwert zu sein braucht.

Bei Verwendung von Saugmäusen konnte den NH₂OH-vorbehandelten Viren (4-Tage bei 20°C ungereinigt; 4-Tage bei 20°C durch Ultrazentrifugation gereinigt) keine Toxizität mehr zugeordnet werden. Applizierte Menge: 0,1 ml, intracerebrale Zufuhr, Hämagglutinationstiter: 1:1000.

TABELLE IV

Ergebnisse der Progenitätsversuche mit Myxoviruspräparationen
Einfluß von Polykationen 1) auf die Virusprogenität

Versuchsmaterial:	Temperatursteigerung über 0,5°C			Latenzzeit (Min.)		
	ohne Polykation	Lysozym	mit Protamin- sulfat	ohne Polykation	Lysozym	mit Protamin- sulfat
A. Influenzavirus (Stamm: A ₂ /Sing./1/57) VI-AF						
HAE: 320	++ (3) 2)	++ (3)	n.d. 3)	70-80	25-60	n.d.
HAE: 20	- (3)	+ (3)	n.d.		40-55	n.d.
VI-AF (56°C bei 1 Std.)						
HAE: 160	+ (3)	+ (3)	n.d.	45-65	20-40	n.d.
VI-Überstand 4)						
HAE: 32	+ (2)	++ (2)	n.d.	20-25	40	n.d.
HAE: ∅	- (3)	+ (3)	n.d.		15-40	n.d.
B. Newcastle Disease-Virus (NDV) NLV-Überstand 4)						
HAE: 80	+ (2)	++ (2)	n.d.	70-105	30	n.d.
HAE: 16	+ (3)	++ (3)	+ (3)	125-155	20-30	100-115
HAE: 1,6	- (3)	+ (3)	(3)		25-45	
HAE: 40	+ (2)	++ (2)	n.d.	55-70	45-50	n.d.
HAE: 3	- (3)	+ (3)	n.d.	120-170	25-40	n.d.
HAE: 20	+ (2)	++ (2)	n.d.	110-120	40-45	n.d.

Erklärungen: 1) Polykationen: Lysozym 0,3 % Endkonzentration
Protaminsulfat 0,3% Endkonzentration

2) (3) : Zahl der gespritzten Kaninchen

3) n.d. : nicht durchgeführt

4) NDV-Überstand: Durch Zentrifugation (75 000 g / 2 Std.)
gewonnener Überstand des Virusmaterials

Erläuterungen zur Tabelle IV

Aus dieser Tabelle und aus den Abbildungen 16, 17 und 18 gehen die Ergebnisse der Versuche über den Einfluß von Polykationen auf die Viruspyrogenität hervor.

Nähere Angaben über das Virusmaterial und Präparationstechnik finden sich in den Abbildungen 16, 17 und 18.

Im einzelnen zeigte sich:

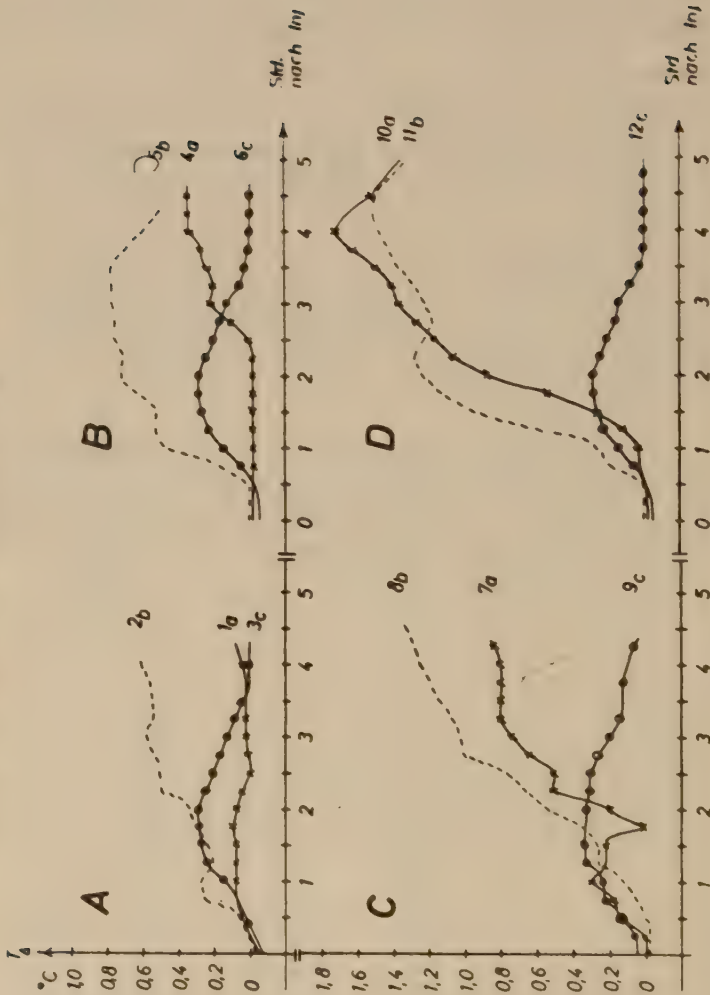
1. Lysozym (0,3 % Endkonzentration) vermochte die Pyrogenität von Influenzavirus- und Newcastle Disease-Viruspräparationen im Sinne einer Temperatursteigerung zu verändern.

Bemerkenswerterweise ergaben sich auch Fieberreaktionen bei Verwendung von Influenza- und Newcastle Disease-Viruspräparationen mit einem negativen Hämagglutinationstiter, wenn sie zusammen mit nichtpyrogenem Lysozym gespritzt wurden.

2. Bei Verwendung von Protaminsulfat als Polykation konnten solche temperatursteigernden Effekte nicht beobachtet werden. Allerdings wurden mit dieser Verbindung nur wenig Versuche durchgeführt.

Abbildung 16

Einfluß von Lysozym auf die Fieberwirkung von Influenzaviren



(Erläuterungen siehe Seite 51 und 52)

Ergebnisse der Pyrogenitätsversuche mit Myxoviruspräparationen:

Beeinflussung der Pyrogenität des Influenzavirus A₂/Sing./1/57 durch Lysozym (siehe auch Tabelle IV).

Erläuterungen zur Abbildung 16:

Abszisse der oberen und unteren Teilabbildungen:
Stunden nach der Applikation des Virus- und
Virus-Lysozymmaterials (jeweils 10 ml pro Tier
intravenös).

Ordinate: Temperaturdifferenzen, bezogen auf die Ausgangstemperaturen (=Normaltemperaturen vor der Applikation des Untersuchungsmaterials) der Kaninchen nach einer bestimmten Zeit.

- A: 1a: Influenzavirussuspensionen (Nachbebrütung der infizierten Eier: 48 Stunden bei 37°C) 1:2000 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Hämagglutinationstiter: negativ (ab 1:2 titriert).
- 2b: Material wie unter 1a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).
- 3c: Kontrollversuch: Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (Endkonzentration 0,3 %, injizierte Menge: 10 ml pro Tier).
- B: 4a: Material: Influenzavirussuspension mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (p_H 7,4) verdünnt. Hämagglutinationstiter: 1:4.
- 5b: Material wie unter 4a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).
- 6c: Kontrollversuch: wie unter 3c beschrieben.

- C: 7a: Material: Influenzavirussuspension, 2 Stunden bei 75 000 g ultrazentrifugiert. Überstand 1+1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung verdünnt. Hämagglutinationstiter: 1:8 ++.
- 8b: Material wie unter 7a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).
- 9c: Kontrollversuch: wie unter 3c beschrieben.
- D: 10a: Material: Influenzavirussuspension 1+1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (p_H 7,4) verdünnt. Hämagglutinationstiter: 1:64 ++.
- 11b: Material wie unter 10a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).
- 12c: Kontrollversuch: wie unter 3c beschrieben.

Abbildung 17
Einfluß von Lysozym auf die Fieberwirkung von Newcastle Disease-Viren



(Erläuterungen siehe Seite 55 und 56)

Abbildung 18
Einfluß von Lysozym auf die Fieberwirkung von Newcastle Disease-Viren



(Erläuterungen siehe Seite 55 und 56)

Ergebnisse der Pyrogenitätsversuche mit Myxoviruspräparationen:

Beeinflussung der Pyrogenität des Newcastle Disease-Virus durch Lysozym (siehe auch Tabelle IV).

Erläuterungen zu den Abbildungen 17 und 18:

Abszisse der oberen und unteren Teilabbildungen:
Stunden nach der Applikation des Virus- und
Virus-Lysozymmaterials (jeweils 10 ml pro Tier
intravenös).

Ordinate: Temperaturdifferenzen, bezogen auf die Ausgangstemperaturen (=Normaltemperaturen vor der Applikation des Untersuchungsmaterials) der Kaninchen nach einer bestimmten Zeit.

A: 1a: Newcastle Disease-Virussuspensionen (Nachbebrütung der infizierten Eier: 48 Stunden bei 37°C) 2 Stunden bei 75 000 g ultrazentrifugierte Ei-Allantoisflüssigkeiten; Überstand 1:50 mit einer physiologischen Kochsalzlösung verdünnt; Hämagglutinationstiter: negativ (ab 1:2 titriert).

2b: Material wie unter 1a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).

3c: Kontrollversuch: Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (Endkonzentration 0,3 %, injizierte Menge: 10 ml).

B: 4a Material und Präparation wie unter 1a beschrieben;
Überstand 1:10 mit einer physiologischen Kochsalzlösung verdünnt. Hämagglutinationstiter: negativ (ab 1:2 titriert).

5b: Material wie unter 4a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).

- 6c: Kontrollversuch: Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (Endkonzentration 0,3 %, injizierte Menge: 10 ml).
- C: 7a: Material wie unter 1a beschrieben;
2 Stunden bei 90 000 g ultrazentrifugiert. Überstand unverdünnt verwendet. Hämagglutinationstiter: 1:8 ++.
- 8b: Material wie unter 7a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).
- 9c: Kontrollversuch: Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (Endkonzentration 0,3 %, injizierte Menge: 10 ml).
- D: 10a: Material und Präparation siehe unter 1a;
Überstand unverdünnt verwendet. Hämagglutinationstiter: 1:16 ++.
- 11b: Material wie unter 10a beschrieben, hier mit Lysozymzusatz (Endkonzentration 0,3 %).
- 12c: Kontrollversuch: Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen (Endkonzentration 0,3 %, injizierte Menge: 10 ml).

TABELLE V

Ergebnisse der Pyrogenitäts- und Toxizitätsversuche mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS)
(Ohne chemische Vorbehandlung)

Versuchsmaterial: bakterielles Lipopolysaccharid	Pyrogennachweis am K a n i n c h e n			Toxizitätsnachweis am H ü h n e r e m b r y o		
	Temperatur- erhöhung > 0,5°C	Anzahl der Tiere	Latenzzeit (Min.)	Dosis r/0,25 ml	Gesamtzahl der Embryonen	davon abgestorben
Dosis r/10,0 ml						
10	++	13	10-30	2,5	15	7
20	++	3	15-25	0,25	10	4
100	++	3	20-40	0,025	25	13
1000	+	1	20	0,0025	25	16
				0,00025	19	12

Erklärung:

LPS: Bacto Lipopolysaccharide E. coli, 026:B₆, Difco Laboratories, Detroit 1 Mich USA.

Erläuterungen zur Tabelle V

Die Tabelle beinhaltet die Ergebnisse der Pyrogen- und Toxizitätsversuche mit einem bakteriellen Lipopolysaccharid.

Sie sollten die Brauchbarkeit des Brutei-Testes ("i.v.-Technik", 94 dreizehntägig vorbebrütete Hühnereier) erneut demonstrieren.

Es konnte gezeigt werden, daß noch eine Konzentration von 0,00025 μ /0,25 ml pro Hühnerembryo letale Wirkungen hervorzurufen vermag.

Die toxischen Erscheinungen glichen makroskopisch denen, wie sie nach intravenöser Applikation von unvorbehandelten Influenzaviren an Hühnerembryonen auftraten.

In den Pyrogenversuchen, die als Vorversuche (siehe Tabelle VI) erforderlich waren, ließ sich die bekannte pyrogene Eigenschaft der bakteriellen Lipopolysaccharide nachweisen; desgleichen das Phänomen, daß hohe Dosen Lipopolysaccharid (hier: 1000 μ /10 ml) im Kaninchentest eine geringere Fieberwirkung hervorrufen können als niedrige Dosen (hier: 10 bis 100 μ /10 ml).

TABELLE VI

Ergebnisse der Pyrogenitätsversuche mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS)
(Ohne bzw. mit chemischer Vorbehandlung)

V e r s u c h s m a t e r i a l

LPS: unvorbehandelt		LPS: mit Äther geschüttelt		LPS + NaNO ₂ 0,1 m (E.K.) 4Tg./20°C		LPS+ NH ₂ OH 1 m (E.K.) 4Tg./20°C		LPS + NH ₂ OH 1 m (E.K.) 4 Tg./20°C + Lysozym 0,3% (E.K.)	
Dosis 10,0 ml	Temperatur- steigerung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Temperatur- steigerung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Temperatur- steigerung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Temperatur- steigerung > 0,5°C	Latenz- zeit (Min.)	Temperatur- steigerung > 0,5°C
1000	+ (1) ¹⁾	20	(+)(2)	25-30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100	++ (3)	20-40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	++ (3)	15-25	n.d.	n.d.	++ (6)	15-30	(3)		
10	++(13)	10-30	++ (3)	30-40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Erklärungen:

LPS: Bacto Lipopolysaccharide E. coli O26:B₆, Difco Laboratories, Detroit 1 Mich USA.

E.K.: Endkonzentration

n.d.: nicht durchgeführt

1) (1): Anzahl der gespritzten Kaninchen

Erläuterungen zur Tabelle VI

Das bakterielle Lipopolysaccharid wurde in diesen Versuchen mit unterschiedlichen chemischen Verbindungen vorbehandelt.

1. NH_2OH -vorbehandeltes LPS (20 ml LPS + 1-mol. NH_2OH , 4 Tage bei 37°C) verlor im Kaninchen-Pyrogentest seine Fieberwirkung. Injektionsmenge: 10 ml pro Tier.
2. Äther-vorbehandeltes LPS (1000 bzw. 10 ml LPS + doppeltes Volumen Äther) behielt seine Pyrogenität. Injektionsmenge: 10 ml pro Tier. Temperatursteigerungen bei 3 Kaninchen: $1,95^\circ\text{C}$, $2,05^\circ\text{C}$ und $2,25^\circ\text{C}$.
3. NaNO_2 hatte keinen Einfluß auf die pyrogene Eigenschaft des LPS (20 ml pro Tier). Temperatursteigerungen bei 3 Kaninchen: $1,60^\circ\text{C}$, $1,90^\circ\text{C}$ und $1,75^\circ\text{C}$.

TABELLE VII

Ergebnisse der Pyrogenitätsversuche mit Hefe-Ribonukleinsäure (RNS)
Einfluß von Lysozym ¹⁾ auf Hefe-RNS

Versuchsmaterial:	Dosis R/10,0 ml intravenöse Applikation	Temperatur- steigerung über 0,5°C		Anzahl der gespritzten Kaninchen		Latenzzeit (Min.)
		ohne Lysozym	mit Lysozym	ohne Lysozym	mit Lysozym	
Hefe-RNS der Fa. Serva, Entwicklungs- labor Heidelberg:	33 600	+	n.d. ²⁾	6	n.d.	25-55 n.d.
	7 000	+	n.d.	3	n.d.	20-25 n.d.
	50 000	+	n.d.	2	n.d.	30 n.d.
	3 750	+	n.d.	3	n.d.	105-130 n.d.
der Fa. E. Merck AG, Darmstadt	1 000	+	n.d.	6	n.d.	10-35 n.d.
	500	-	(+)	9	6	15-45
	250	-	-	3	-	-
	100	-	n.d.	3	n.d.	n.d.
	50	-	n.d.	3	n.d.	n.d.
	20	n.d.	-	n.d.	3	n.d.
+ NH ₂ OH 1 mol (E.K.) ⁴⁾ Tg./20°C	10	-	n.d.	3	n.d.	n.d.
	50 000	+	n.d.	3	n.d.	40-50 n.d.

Erklärungen:

1) Lysozym: 0,3% Endkonzentration

2) n.d. : nicht durchgeführt

3) Reinigung der Hefe-RNS durch Fällung mit Äthylalkohol

4) E.K.: Endkonzentration

Erläuterungen zur Tabelle VII

Zwei Hefe-RNS-Präparationen verschiedener Hersteller wurden auf ihre Pyrogenität hin getestet.

Die Hefe-RNS-Präparation der Fa. E. Merck AG, Darmstadt, zeigte folgendes Verhalten:

1. Nach Applikation von 10 bis 500 μ /10 ml pro Tier traten keine Temperaturerhöhungen auf.
2. Höhere Dosen waren pyrogen (entspricht Befunden aus der Literatur).
3. Lysozym bzw. auch NH_2OH konnten die pyrogene Wirkung dieser Hefe-RNS nicht beeinflussen.

Die Hefe-RNS-Präparation der Fa. Serva war gleichfalls pyrogen.

TABELLE VIII

Fieberwirkung von Kaninchenserum
Versuche zur Übertragung des endogenen, leukozytären Pyrogens

Versuchsmaterial	Anzahl der ml i.v.	Temperatur- steigerung über 0,5°C	Anzahl der gespritzten Tiere	Latenz- zeit (Min.)	Methodische Hinweise
Normal-Seren	10,0	+	1	10	Spenderblut mit Antikoagulans ¹⁾ ; 1 Std. bei 4°C, Plasmagewinnung durch Zentrifugation (15'/4000 UPM) Aufbewahrung: 15 Std. bei 4°C
	16,0	+	1	10	
3	18,0	+	2	10-15	Spenderblut mit Antikoagulans; 20 Std. bei 4°C, Plasmagewinnung durch Zentrifugation (15'/4000 UPM) Anschließende Plasmaübertragung
4	18,0	-	2		Spenderblut ohne Antikoagulans; sofortige Serumgewinnung durch Zentrifugation (15'/4000 UPM) Aufbewahrung: 24 Std. bei 4°C
5	6,0	-	2		Spenderblut ohne Antikoagulans; sofortige Serumgewinnung durch Zentrifugation (15'/4000 UPM) Sofortige Serumübertragung
Serum fiebern- der Tiere ²⁾	6,0	+	1	10	Spenderblut ohne Antikoagulans; sofortige Serumgewinnung durch Zentrifugation (15'/4000 UPM) Sofortige Serumübertragung
	20,0	+	1	10	
8	16,0	+	1	15	Spenderblut ohne Antikoagulans; 1 Std. bei 4°C, Serumgewinnung durch Zentrifugation (15'/4000 UPM) Aufbewahrung: 24 Std. bei 4°C

Erklärungen: 1) Antikoagulans: 20 ml einer 5 %igen Natriumcitratlösung auf 100 ml Blut

2) exogenes Pyrogen: Influenzavirus infizierte Allantoisflüssigkeit (HAE: 20 000)
(Stamm: A₂/Sing./1/57)

Erläuterungen zur Tabelle VIII

Unsere Technik, nach welcher das Spenderblut ohne Antikoagulantien sofort scharf zentrifugiert wird, hat den Vorteil, daß die gelegentlich auftretenden pyrogenen Reaktionen (siehe Tabelle VIII, Querspalte 1, 2 und 3) nach Gaben von Normalseren ausbleiben.

In Modellversuchen konnte gezeigt werden, daß jedoch das Serum fiebernder Tiere - mit dieser Technik übertragen - in Empfängertieren pyrogene Aktivitäten auslöste.

TABELLE IX

Ergebnisse der Pyrogenitätsversuche mit Poliomvelitispräparationen ¹⁾

Versuchsmaterial	Anzahl der ml i.v.	Temperatur- steigerung über 0,5°C	Anzahl der gespritzten Tiere	Latenzzeit
Virusmaterial unvorbehandelt	10,0	-	3	
mit Phenol (80%) vorbehandelt	10,0	-	3	

Erklärung:

1) Polio Typ I, Mahoney, Eagle, HEP/2, ohne Serumzusatz, $1,5 \cdot 10^8$ PFU/ml

Erläuterungen zur Tabelle IX

Ausgehend von der Überlegung, daß möglicherweise große Mengen von Polioviren oder Polio-RNS-Präparationen (durch Phenolextraktion der Viria gewonnen) pyrogen sein könnten, sind die Versuche in Tabelle IX durchgeführt worden.

Es konnte gezeigt werden:

1. Hochtitrige (ungereinigte) Polioviruspräparationen erwiesen sich als apyrogen.
2. Desgleichen riefen auch phenolextrahierte Poliopräparationen kein Fieber im Kaninchentest hervor.

TABELLE X

Ergebnisse der Versuche, mit unvorbehandeltem Influenzavirusmaterial
eine homologe pyrogene Toleranz auszulösen

Versuchsmaterial	Applikation	Hämagl.- titer	Dosis (ml)	Temperatur- steigerung (°C)			Latenzzeit (Min.)
Influenzavirus (Stamm: A ₂ /Sing./1/57)- infizierte Allantoisflüssigkeit	1. Injektion	1:4096	7,0	1,55	1,80	1,70	45 - 55
	2. Injektion	1:4096	7,0	0,40	0,40	0,15	
	1. Injektion	1:2048	5,0	0,95	1,80	0,80	110 - 120
	2. Injektion	1:4096	5,0	0,30	0,45	0,15	
	1. Injektion	1:1024	10,0	0,90	0,90	1,45	30 - 55
	2. Injektion	1:1024	10,0	0,0	0,0	0,0	
	1. Injektion	1:2048	3,0	1,10	0,90	0,80	80 - 115
	2. Injektion	1:2048	3,0	0,0	n.d.	0,0	
	1. Injektion	1:1024	3,0	0,60	0,22	0,82	30 - 115
	2. Injektion	1:2048	3,0	0,60	0,60	n.d.	100 - 120
	3. Injektion	1:2048	3,0	0,0	0,10	n.d.	

Erklärungen:

2. Injektion: 24 Stunden nach der 1. Injektion
3. Injektion: 48 Stunden nach der 1. Injektion
n.d. : nicht durchgeführt

Erläuterungen zur Tabelle X

Die Tiere, die zur Einstellung und Kontrolle unseres Testsystems mit den verschiedensten Quantitäten von nativen Influenzaviren gespritzt wurden, reagierten im allgemeinen mit Temperaturerhöhungen. Zudem ließ sich bei ihnen die Erscheinung der homologen pyrogenen Toleranz, z.T. vollständig ausgebildet, auslösen. Es ist aus der Zusammenstellung ersichtlich, daß die Temperaturerhöhungen und das Ausmaß der Toleranz variieren. Insbesondere soll auf ein Kaninchen hingewiesen werden (6. Kolumne, dritte Zahlenangabe von unten = $0,22^{\circ}\text{C}$), das - verglichen mit den beiden anderen Tieren - eine besonders geringe Reaktion zeigte. Obwohl solche unterschiedlichen Reaktionen beim Arbeiten mit Virusmaterial sehr selten zu beobachten waren, könnte daran gedacht werden, die Tiere auch für derartige Untersuchungen mit Hilfe eines Pyrogenstandards, z.B. vor Versuchsbeginn, auf ihre Eignung zu prüfen.

TABELLE XI

Ergebnisse der Versuche, mit interferonreichen Allantoisflüssigkeiten
eine pyrogene Toleranz gegen Influenzaviren¹⁾ auszulösen

<u>Versuchsmaterial:</u>		Hämaggl.- titer	Dosis (ml.)	Temperatur- steigerung (°C)	Latenzzeit (Min.)
Zur Erstinjektion : Interferonreiche virusfreie Allantoisflüssigkeit					
Zur Zweitinjektion: Influenzavirus-infizierte Allantoisflüssigkeit					
	1. Injektion	-	10,0	0,20	80 - 150
	2. Injektion 4 Std. später	1:2048	3,0	1,40 0,70 1,10	
	1. Injektion	-	10,0	0,15 0,35 0,45	45 - 70
	2. Injektion 4 Std. später	1:1024	10,0	2,10 1,75 1,90	

Erklärung:

1) Influenzaviren (Stamm: A₂/Sing./1/57)

Erläuterungen zur Tabelle XI

Interferonreiche virusfreie Allantoisflüssigkeiten erwiesen sich unter Verwendung von 15 Kaninchen als apyrogen (siehe auch Tabelle I). Eine sichere Erklärung für den Befund, daß ein Tier eine Temperatursteigerung von $1,5^{\circ}\text{C}$ zeigte, haben wir nicht. Eine Zweitinjektion von virus-haltigen Präparationen führte meist zu starken Temperaturerhöhungen, so daß wir annehmen müssen, daß Interferon unter diesen Versuchsbedingungen keine Toleranz zu induzieren vermochte.

TABELLE XII

Ergebnisse der Versuche, mit Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviruspartikeln¹⁾
eine pyrogene Toleranz gegen unvorbehandelte Viren auszulösen

Versuchematerial:	Hämaggl.- titer	Dosis (ml)	Temperatur- steigerung (°C)	Latenzzeit (Min.)
Zur Erstinjektion: NH ₂ OH-vorbehandelte Viruspartikel Zur Zweitinjektion (24 Std. später): unvorbehandelte Viren				
Einwirkungszeit des NH ₂ OH: 1 Tag /37°C	1:2048	5,0	0,80	45 - 145
2. Injektion	1:2048	5,0	1,20	90 - 100
Einwirkungszeit des NH ₂ OH: 2 Tage/37°C	1:2048	5,0	0,40	
2. Injektion	1:2048	5,0	1,15	100 - 115
Einwirkungszeit des NH ₂ OH: 3 Tage/37°C	1:2048	5,0	0,30	
2. Injektion	1:2048	5,0	0,85	95 - 115

Erklärung:

1) Influenzaviruspartikel (Stamm: A₂/Sing./1/57)

Hydroxylamin (NH₂OH)-vorbehandelte Viren
NH₂OH 1 mol Endkonzentration

TABELLE XIII

Ergebnisse der Versuche, mit Hydroxylamin-vorbehandelten Influenzaviruspartikeln eine pyrogene Toleranz gegen unvorbehandelte Viren auszulösen

Versuchsmaterial:	Hämaggl.- titer	Dosis (ml)	Temperatur- steigerung (°C)	Latenz- zeit (Min.)
Zur Erstinjektion: NH_2OH -vorbehandelte Viruspartikel				
Zur Zweitinjektion (24 Std. später): unvorbehandelte Viren				
Zur Viertinjektion (72 Std. später)				
Einwirkungszeit des NH_2OH : 4 Tage/37°C	1:1004	5,0	0,15	0,15
2. Injektion	1:4096	5,0	1,15 0,15 1,60 1,40 1,20	60-85
Einwirkungszeit des NH_2OH : 4 Tage/37°C	1:2048	20,0	0,40 0,30 0,45	110-120
2. Injektion	1:4096	5,0	1,90 0,70 2,10	
Einwirkungszeit des NH_2OH : 4 Tage/37°C	1:2048	5,0	0,10 0,20 0,50	85-100
2. Injektion	1:4096	5,0	1,50 1,15 1,55	
Einwirkungszeit des NH_2OH : 4 Tage/20°C	1:2048	7,0	0,15 0,55 0,50 0,00	60-95
2. Injektion	1:2048	7,0	1,95 1,30 1,55 1,00 1,05 ²⁾	
Einwirkungszeit des NH_2OH : 4 Tage/20°C	1:2048	5,0	0,00 0,68 0,70	95-120
2. Injektion ³⁾	1:2048	5,0	n.d. ¹⁾ 0,25 0,10	
3. Injektion ³⁾	1:2048	5,0	n.d. 0,00 0,00	
4. Injektion ⁴⁾	1:2048	3,0	n.d. 1,00 0,75 1,20 ²⁾	

Erklärungen: 1) nicht durchgeführt

2) Kontrolle (einmalige Injektion mit unvorbehandelten Viruspartikeln)

3) NH_2OH -vorbehandelte Viruspartikel

4) NH_2OH -unvorbehandelte Viruspartikel

Erläuterungen zu den Tabellen XII und XIII

Intensiv mit Hydroxylamin vorbehandeltes Virusmaterial, das sich in unseren Versuchen (siehe Tabelle III) als apyrogen erwies, konnte in den in diesen Tabellen zusammengestellten Ergebnissen unserer Untersuchungen keine pyrogene homologe Toleranz auslösen.

Variiert wurden: die Einwirkungszeit von Hydroxylamin, die Temperatur während der Inkubation des Virus-NH₂OH-Gemisches und die Injektionsdosis.

Hervorzuheben ist ein Befund in Tabelle XII (erste Querspalte). Er zeigt, daß weniger intensiv mit Hydroxylamin vorbehandelte Viren (24-stündige Inkubation) noch eine nachweisbare Temperatursteigerung bewirken, die aber auffallenderweise mit keiner Toleranzbildung verknüpft ist.

TABELLE XIV

Ergebnisse der Versuche, mit Hefe-Ribonukleinsäure (RNS)
eine homologe pyrogene Toleranz auszulösen

Versuchsmaterial	Dosis r/7 ml	Temperatur- steigerung (°C)	Latenzzeit (Min.)
Hefe-RNS			
der Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg	33 600	1,35 1,30 0,50	35 - 50
der Fa. E. Merck AG, Darmstadt	70 000	1,55 1,25 1,20	30 - 35
der Fa. E. Merck AG, Darmstadt	70 000	keine Temp.-messung	
der Fa. E. Merck AG, Darmstadt	70 000	1,45 1,25 1,20	30 - 50
der Fa. E. Merck AG, Darmstadt	70 000	1,40 1,20 n.d. ¹⁾	35 - 40

Erklärung:

1) n.d.: nicht durchgeführt

Erläuterungen zur Tabelle XIV

Die Ergebnisse machen deutlich, daß die verwendeten Hefe-RNS-Präparationen in den angezeigten Konzentrationen fieberauslösend waren (siehe auch Tabelle VII), jedoch keine pyrogene homologe Toleranz auszubilden vermochten.

Dieser Befund bestätigt Angaben von Dressel u. Jacker (1966), die Hefe-RNS auch aus diesem Grunde als Pyrogenstandard empfehlen.

TABELLE XV

Ergebnisse der Pyrogenitätsversuche mit Staphylokokken

Versuchsmaterial	Keimzahl/10 ml	Temperatursteigerung (°C)			Latenzzeit				
		ohne	1) Lysozym	mit	ohne Lysozym (Min.)	mit Lysozym (Min.)			
Staph. aureus SG 511	10 ¹¹	2,05	1,55	2,00	1,55	1,60	1,20	20 - 50	05 - 50
	10 ¹⁰	0,10	1,60	0,33	1,00	1,20	0,05	20	25 - 50
	10 ⁹	0,50	0,15	0,50	n.d. ²⁾	n.d.	n.d.	45 - 55	n.d.
	10 ⁸	2,05	2,55	0,55	1,30	1,80	1,37	20 - 45	15 - 40

Erklärungen:

1) Lysozym 0,3% Endkonzentration

2) n.d.: nicht durchgeführt

Erläuterungen zur Tabelle XV

Diese Untersuchungen sollten verdeutlichen, daß die Tiere bei Verwendung von Staphylokokken als exogene Pyrogene unterschiedlich reagieren. In unseren Versuchen waren die Temperaturdifferenzen innerhalb einer Versuchsreihe (bei der jedes Tier die gleiche Keimzahl appliziert bekam) größer als bei Viruspyrogenversuchen. Aus diesem Grunde läßt sich ein Lysozymeffekt schwer abschätzen. Möglicherweise lassen sich diese Mängel durch vorherige Tierselektion weitgehend ausschalten.

Elektronenmikroskopische Darstellungen⁺ unbehandelter
und mit Hydroxylamin-vorbehandelter Influenzaviren
(Stamm: A₂/Sing./1/57)

Abbildungen 19, 20 und 21: Darstellungen unvorbehandelter,
gereinigter Influenzaviren.

Abb. 19

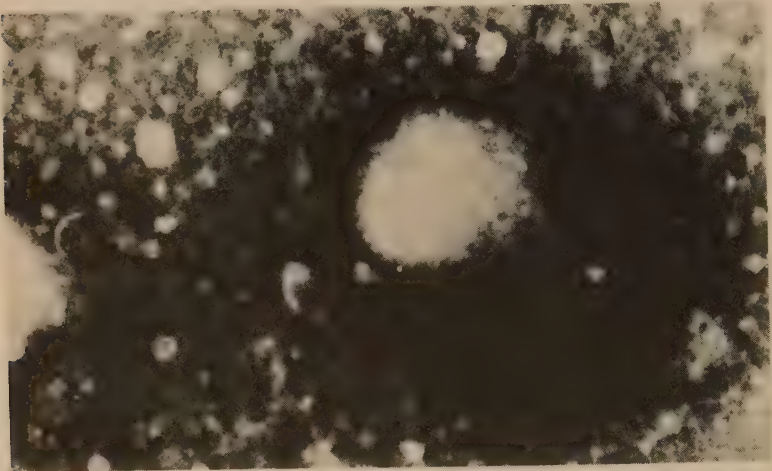
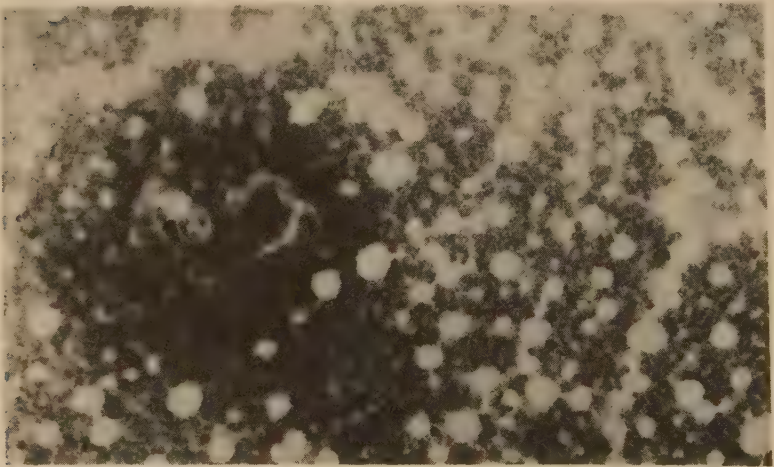
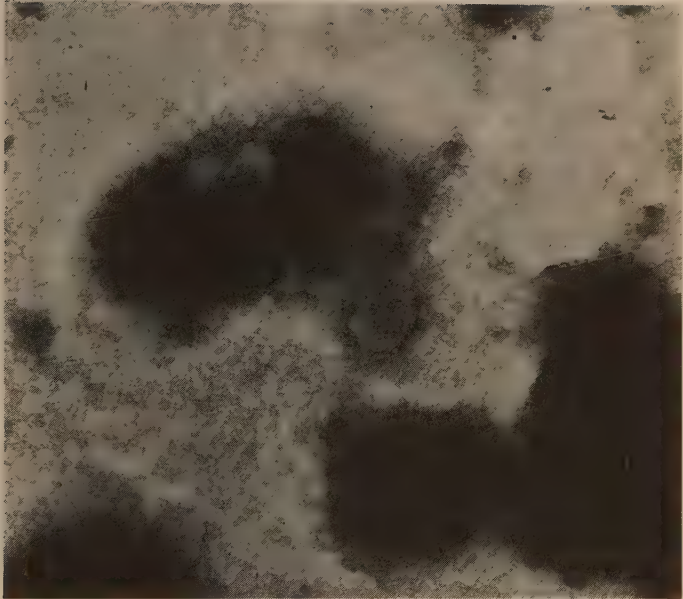


Abb. 20



⁺ Die Abbildungen 19 bis 23 verdanken wir der Freundlichkeit
der Herren Priv.-Doz. Dr. med. Merker und Dr. med. Wollf
(Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien
Universität Berlin).

Abb. 21



Erläuterungen zu den Abbildungen 19, 20 und 21:

Vergrößerung: 105 000:1

Die Hämagglutinin"platten" bzw. -"spikes" sind gut sichtbar. Der Verband dieser Untereinheiten ist nirgends unterbrochen. Strukturen am "Innenkörper" sind nicht erkennbar. Die Bilder decken sich mit den in der Literatur bereits vorliegenden Aufnahmen.

Abbildungen 22 und 23: Darstellungen von mit Hydroxylamin-
vorbehandelten, gereinigten Influenzaviren.

Abb. 22

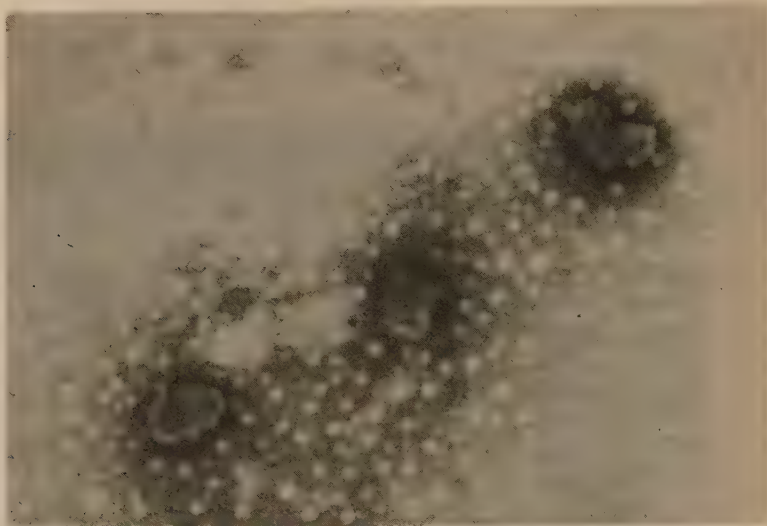
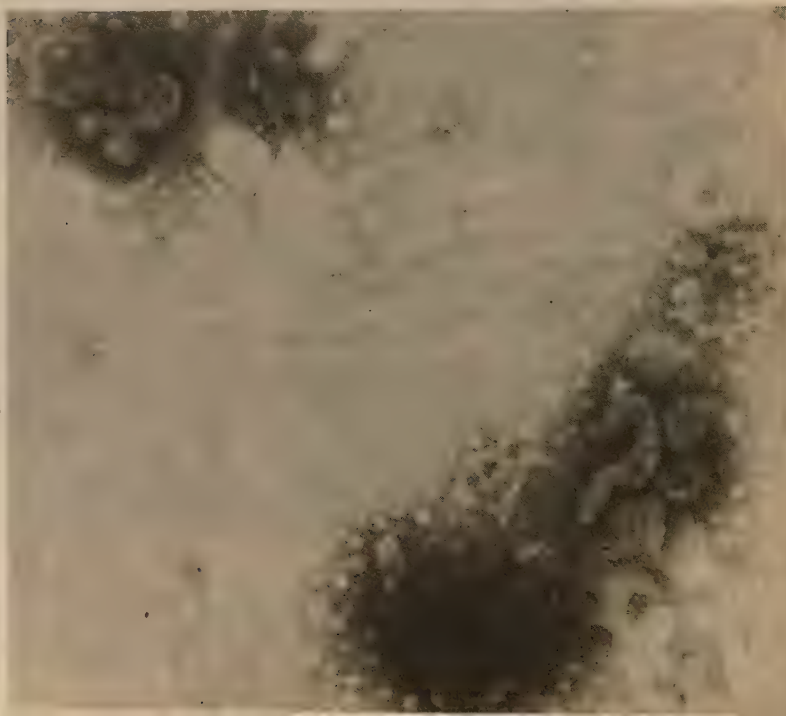


Abb. 23



Erläuterungen zu den Abbildungen 22 und 23:

Vergrößerung: 105 000:1

NH₂OH: 1 mol Endkonzentration,

Einwirkung: 4 Tage bei 37°C.

Die Durchsicht einer Reihe von Gesichtsfeldern hat ergeben, daß intensiv mit Hydroxylamin vorbehandelte Viren z.T. unscharfe Konturen (Einbuchtungen, Polymorphie) zeigen (Abbildungen 22 und 23). Allerdings finden sich auch Viruspartikel in größerer Zahl, die morphologisch nicht von den unvorbehandelten Viren zu unterscheiden sind.

C. DISKUSSION

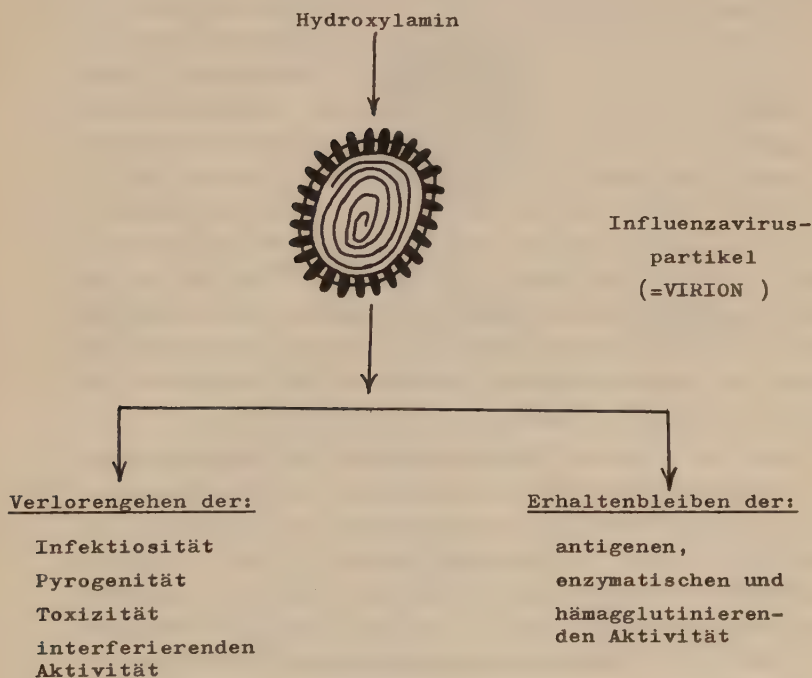
I. Virusinaktivierungsstudien mit Hydroxylamin

Nachdem von verschiedenen Untersuchern die Wirkung von Hydroxylamin auf die unterschiedlichsten biologischen Viruseigenschaften geprüft worden war (siehe Seite 19 und Abbildung 24), stellte sich im Zusammenhang mit der Propagierung von NH_2OH -inaktivierten Influenzaviren als aktiver Impfstoff die Frage nach seinem Einfluß auf das exogene Influenzaviruspyrogen. Zunächst interessierte, ob derart inaktivierte Viren überhaupt noch pyrogen und toxisch sind, und zum anderen erhofften wir, weitere Rückschlüsse auf die Natur des exogenen Viruspyrogens zu erhalten. Es war denkbar, daß Hydroxylamin nicht nur die Virus-Ribonukleinsäure beeinflusst (Verlorengehen der Infektiosität), sondern noch andere Virusbausteine dieses komplex zusammengesetzten Virus inaktiviert.

Zuerst erhoben wir den Befund, daß intensiv mit NH_2OH -vorbehandelte Influenzaviren ihre pyrogene Wirkung verlieren. Für einen aktiven Impfstoff, den Schäfer (Kongreßberichte, 1966) z.Z. in den USA erprobt, sicher eine positive Eigenschaft; zumal die bekannten antigenen Viruseigenschaften auch nach der NH_2OH -Einwirkung unverändert erhalten bleiben (Schäfer u. Rott, 1962; Großgebauer, 1966). Andere Untersucher versuchen die pyrogenen Viruseigenschaften der aktiven Influenzavirus-Impfstoffe durch Gaben des isolierten Virushämagglutinins zu vermeiden (Davenport u. Mitarb., 1964). Dabei sind sie jedoch genötigt, die Integrität des Viruspartikels durch die Einwirkung von Äther zu zerstören. In diesem Zusammenhang konnten wir den Befund von Siegert u. Braune (1964, 1964a) bestätigen, nach dem Äther-destruierte Influenzaviren apyrogen werden. Aber auch andere biologische Viruseigenschaften gehen nach Aufbrechung des Lipidmantels durch Äther verloren (siehe Abbildung 25).

Abbildung 24

Folgen der intensiven Einwirkung von
Hydroxylamin auf Influenzaviren



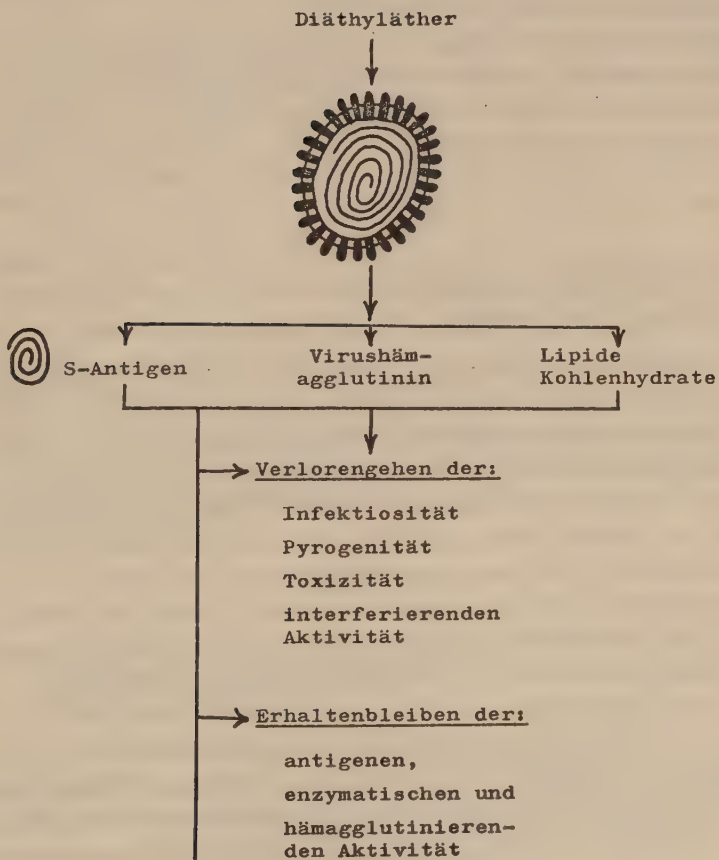
Zur Frage, welche zusätzlichen Influenza-Virusbausteine von Hydroxylamin inaktiviert werden, haben wir in Modellversuchen mit bakteriellem Lipopolysaccharid Stellung genommen. Hiernach scheint Hydroxylamin auch Lipide zu beeinflussen, da das verwendete Lipopolysaccharid seine fiebererzeugende Eigenschaft durch diese Vorbehandlung einbüßte. Auf das Influenzavirus übertragen, würde dieser Befund bedeuten, daß neben der Virus-Ribonukleinsäure auch oberflächlich gelegene Lipide (wirtseigene?) verändert werden. Eine sichere Erklärung für die Folgen einer solchen NH_2OH -Einwirkung ist heute noch nicht möglich. NH_2OH -vorbehandelte Influenzaviren, die ihre Infektiosität, Pyrogenität, interferierende Aktivität sowie ihre Toxizität verloren haben, ihre hämagglutinierenden und antigenen Eigenschaften jedoch noch aufweisen, können möglicherweise nicht mehr in der Lage sein, "normal" in die empfängliche Wirtszelle einzudringen. Das hieße, daß Hydroxylamin auch die zellpenetrierenden Eigenschaften beeinflusst. Die Zerstörung der leukozytären Lysosome und die damit verbundene Ausschüttung von pyrogenen Stoffen würden demnach verhindert werden, so daß hierin eine hypothetische Erklärung für das Ausbleiben des Fiebers im Kaninchen-Pyrogentest liegen könnte.

Aber auch die toxischen Influenzavirus-Eigenschaften konnten nach intensiver NH_2OH -Vorbehandlung zerstört werden. Hierzu bedienten wir uns des embryonierten Hühnereies als Indikator für eine toxische Viruswirkung⁺. Auch dieser Befund könnte mit der Beeinflussung des Virus-Penetrationsmechanismus durch Hydroxylamin erklärt werden. Offensichtlich handelt es sich bei den "Virustoxinen" um biologisch aktive Substanzen, deren Eigenschaften von den klassischen bakteriellen Toxinen größtenteils verschieden sind (siehe u.a. bei Stickl, 1963; Rott u. Müller, 1965).

⁺ Das Verfahren der intravenösen Zufuhr des Untersuchungsmaterials ist auch von anderer Seite für die verschiedensten Zwecke verwendet worden (Smith u. Thomas, 1956; Kétyi, 1964; Louie u. Fong, 1964; Powell u. Finkelstein, 1966; Milner u. Finkelstein, 1966; Fiszer-Szafarz, 1967; Großgebauer u. Langmaack, 1967). Diese Methode erwies sich als relativ leicht erlernbar und scheint uns empfehlenswert zu sein.

Abbildung 25

Folgen der Einwirkung von
Diäthyläther auf Influenzaviren



Es bleibt noch zu klären, ob es die (lipidhaltige) "Normalkomponente"⁺ des Influenzavirus ist, die vom Hydroxylamin inaktiviert wird. Zudem ist noch unklar, ob und in welcher Weise diese "Normalkomponente" an der Auslösung von Fieber und Toxizität beteiligt ist.

Die Auswertung der elektronenoptischen Aufnahmen von Hydroxylamin-vorbehandelten, gereinigten Influenzaviren führte zu keinem eindeutigen Resultat.

Zwischen "normalen" Elementarkörperchen, wie sie in der Literatur bekannt geworden sind, fanden sich auch auffällig struktuierte Viren in den Gesichtsfeldern (eingebuchtete, polymorphe Gebilde).

II. Untersuchungen zur Beeinflussung der pyrogenen Viruswirkung durch Lysozym

Die biologischen Wirkungen der verschiedensten Polyelektrolyte⁺⁺ auf Viren, Bakterien und Protozoen sind in den letzten Jahren intensiv erforscht worden. Im Falle des Lysozyms gibt es Beispiele dafür, daß in Anwesenheit dieses Polykations die Penetrationsrate von *Toxoplasma gondii* ansteigt (Lycke u. Norrby, 1966) oder, daß es z.B. die toxischen Eigenschaften eines bakteriellen Endotoxins verändert (Mergenhagen u. Martin, 1964). Aber auch andere Polykationen, z.B. Protaminsulfat beeinflussen biologische Wirkungen von Viren (siehe u.a. bei Warren u. Mitarb., 1965) oder Bakterien (Großgebauer, 1967b). Da gezeigt werden konnte, daß sich Lysozym auch an Influenzaviren anlagern kann (Großgebauer, persönliche Mitteilung, 1966c), interessierte die Frage nach dem Einfluß dieser Verbindung auf die pyrogene Viruswirkung. Wir konnten nachweisen, daß Lysozym zu-

⁺ Wirtseigenes Material, das während des Virusreifungsprozesses in das Influenza-Viruspartikel eingebaut wird.

⁺⁺ darunter versteht man Makromoleküle mit positiver Ladung (Polykationen) oder mit negativer Ladung (Polyanionen).

sammen mit schwach pyrogenen oder apyrogenen Quantitäten von Influenza- bzw. Newcastle Disease-Viren eine das Fieber verstärkende Wirkung aufwies. Es ist zu vermuten, daß die lipidhaltigen Viren mit (angelagertem?) Lysozym leichter und rascher phagozytiert werden und größere körpereigene Pyrogenmengen freisetzen.

Der Befund weist unseres Erachtens auf Zusammenhänge zwischen Fieber und unspezifischen Abwehrstoffen des Körpers hin. Es sind jedoch noch zahlreiche Versuche erforderlich, um diese Beziehungen genauer zu bestimmen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß - zumindest beim Hund - eine enge Korrelation zwischen dem Serumlysozymspiegel und der Menge an endogenem Pyrogen im Serum dieser Tiere besteht (Petersdorf u. Mitarb., 1960; Shulman u. Petersdorf, 1963).

Siegert und Mitarbeiter (1967) teilten kürzlich mit, daß es ihnen gelang, mit Hilfe von Lysozym das pyrogene Prinzip von Myxoviren abzuspalten. Einschränkend bemerken diese Autoren, daß diese Abspaltung jedoch nicht mit jeder Lysozym-Charge gelingt. Unseres Erachtens könnte es sich bei der Fieberwirkung in ihren Versuchen um die pyrogene Wirkung eines Virus-Lysozym-Komplexes handeln, so daß die Annahme einer Pyrogenabspaltung unserer Meinung nach noch nicht bewiesen ist.

III. Wesentliche Diskussionspunkte zu den übrigen experimentellen Abschnitten

Die Versuche mit Hefe-Ribonukleinsäure bestätigen die Befunde anderer Autoren, daß sich diese Verbindung möglicherweise als Pyrogenstandard eignet. Vor allem führte die Hefe-Ribonukleinsäure nicht zur Sensibilisierung der Tiere.

Allerdings ist noch ungeklärt, ob die pyrogene Wirkung der Hefe-Ribonukleinsäure nicht ausschließlich durch obligate bakterielle Verunreinigungen hervorgerufen wird, wie das auch von Westphal (zitiert nach: Dressel u. Jacker, 1966)

vermutet wird. Wäre das der Fall, dann würde man jedoch ein gewisses Maß an Toleranzentwicklung erwarten.

Unserer Meinung nach ist es an der Zeit, zumindest für bestimmte Pyrogenversuche, z.B. Studien mit Staphylokokkenpyrogenen, eine Tierausswahl vorzunehmen. Die Untersuchungen mit diesen Keimen haben gezeigt (siehe Tabelle XIV), daß die nicht selektierten Kaninchen im Hinblick auf Temperaturerhöhungen außerordentlich unterschiedlich reagieren. Möglicherweise hat ein Teil der Tiere eine solche bakterielle Infektion unerkannt durchgemacht. Gezielte Serumanalysen würden evtl. weitere Hinweise geben.

Im Zusammenhang mit der Frage der pyrogenen Wirkung von Hefe-Ribonukleinsäure stehen unsere Versuche, der Polio-Ribonukleinsäure (und dem vollständigen Poliovirus) eine fiebererzeugende Wirkung zuzuordnen. Mit beiden Präparationen gelang es uns nicht, pyrogene Reaktionen beim Kaninchen auszulösen. Allerdings ist damit nicht ausgesagt, ob nicht doch größere Quantitäten an Polio-Ribonukleinsäure Fieber induzieren. Somit muß die Frage der Pyrogenität von Virusnukleinsäuren noch offen bleiben. Auch Slifkin u. Isacson (1965) haben bei Pyrogenuntersuchungen von phenolextrahierten Parainfluenzaviren keine eindeutigen Ergebnisse erzielt.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch chemische Eingriffe am Influenzavirus und in weiteren Versuchen durch Zusatz von Polykationen die pyrogene Wirkung des Influenza- und Newcastle Disease-Virus zu beeinflussen, um nähere Rückschlüsse auf die Natur und Wirkungsweise des exogenen Virus-Pyrogens zu erhalten. Es wurde gefunden, daß nach einer intensiven NH_2OH -Behandlung die pyrogene und toxische Wirkung der Influenzaviren sowie deren Fähigkeit, eine homologe Toleranz auszulösen, verloren gehen.

Da auch bakterielles Lipopolysaccharid seine Fieberwirkung nach längerer Einwirkung von NH_2OH verliert, vermuten wir, daß Hydroxylamin nicht nur auf die Virus-Ribonukleinsäure, sondern auch auf oberflächlich gelegene Lipide inaktivierend wirkt.

Lysozym förderte den Eintritt der pyrogenen Viruswirkung insofern, als es zusammen mit apyrogenen Virusmengen deutliche Temperatursteigerungen hervorrief.

Zum Nachweis der toxischen Eigenschaften von Viren und Lipopolysaccharid diente das Brutei, dem das Untersuchungsmaterial intravenös appliziert wurde. Diese wenig verbreitete Nachweisttechnik wird ausdrücklich empfohlen.

Versuche mit Hefe-RNS-Präparationen bestätigen deren pyrogene Wirkung im Kaninchentest sowie das Ausbleiben einer Sensibilisierung der Tiere durch diese Verbindungen. Eine Verwendung von Hefe-RNS als Pyrogenstandard, wie sie von anderer Seite empfohlen wird, scheint daher möglich.

Eine verbesserte Technik der Übertragung von Normal-Kaninchenseren und Seren fiebernder Tiere wird beschrieben. Sie besteht darin, das gewonnene Blut sofort ohne Zusatz von Antikoagulantien scharf zu zentrifugieren.

Versuche mit hochtitrigen Poliomyelitisviruspräparationen, die in einem weiteren Versuchsansatz durch Phenolextraktion

deproteinisiert wurden, bestätigen deren Unvermögen, im Kaninchen Fieber zu induzieren.

Die Ergebnisse der Pyrogenversuche mit Staphylokokken werfen erneut die Frage der Notwendigkeit eines Pyrogenstandards zur Tierselektion auf.

E. SCHRIFTTUMVERZEICHNIS

1. Altstein, A.D.,
G.I. Deichman u.
N.N. Dodonova: Induction of specific antitumor immunity in hamsters with hydroxylamine-inactivated SV40 virus. *Virology* 30, 747 (1966)
2. Atkins, E. u.
W.B. Wood, Jr.: Studies on the pathogenesis of fever.
I. The presence of transferable pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. *J. Exper. Med.* 101, 519 (1955)
3. Atkins, E. u.
W.B. Wood, Jr.: Studies on the pathogenesis of fever.
II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. *J. Exper. Med.* 102, 499 (1955a)
4. Atkins, E. u.
W.C. Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses.
I. The appearance of an endogenous pyrogen in the blood following intravenous injection of virus. *J. Exper. Med.* 107, 383 (1958)
5. Atkins, E. u.
W.C. Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses.
II. The effects of endogenous pyrogen in normal and virus-tolerant recipients. *J. Exper. Med.* 107, 403 (1958a)
6. Atkins, E. u.
W.C. Huang: Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses.
III. The relation of tolerance to the production of endogenous pyrogen. *J. Exper. Med.* 107, 415 (1958b)

7. Atkins, E.,
M. Cronin u.
P. Isacson:
Endogenous pyrogen release from
rabbit blood cells incubated in
vitro parainfluenza virus.
Science 146, 1469 (1964)
8. Atkins, E. u.
E.S. Snell:
Fever.
In: The Inflammatory Process
Academic Press;
New York, London 1965, S. 495
9. Bennett, I.L., Jr.:
Observations on the fever caused
by bacterial pyrogens.
I. A study of the relationship
between the fever caused by bac-
terial pyrogens and the fever
accompanying acute infections.
J. Exper. Med. 88, 267 (1948)
10. Bennett, I.L., Jr.:
Observations on the fever caused
by bacterial pyrogens.
II. A study of the relationship
between the fevers caused by bac-
terial pyrogens and by the intra-
venous injection of the sterile
exudates of acute inflammation.
J. Exper. Med. 88, 279 (1948a)
11. Bennett, I.L., Jr.;
R.R. Wagner u.
V.S. Lequire:
Pyrogenicity of influenza virus
in rabbits.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med.,
(N.Y.) 71, 132 (1949)
12. Bennett, I.L., Jr.
u. P.B. Beeson:
Studies on the pathogenesis of
fever.
I. The effect of injection of
extracts and suspensions of un-
infected rabbit tissues upon the
body temperature of normal rabbits.
J. Exper. Med. 98, 477 (1953)

13. Bennett, I.L., Jr.
u. P.B. Beeson:
Studies on the pathogenesis of fever.
II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leucocytes and from the fluid of sterile exudates.
J. Exper. Med. 98, 493 (1953a)
14. Berlin, R.D. u.
W.B. Wood, Jr.:
Studies on the pathogenesis of fever.
XII. Electrolytic factors influencing the release of endogenous pyrogen from polymorphonuclear leucocytes.
J. Exper. Med. 119, 697 (1964)
15. Berlin, R.D. u.
W.B. Wood, Jr.:
Studies on the pathogenesis of fever.
XIII. The effect of phagocytosis on the release of endogenous pyrogen by polymorphonuclear leucocytes.
J. Exper. Med. 119, 715 (1964a)
16. Bleichert, A.:
Grundlagen biologischer Regelung.
Klin. Wschr. 40, 497 (1962)
17. Bodel, P. u.
E. Atkins:
Human leucocyte pyrogen producing fever in rabbits.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 121, 943 (1966)
18. Bornstein, D.L.,
C. Bredenberg u.
W.B. Wood, Jr.:
Studies on the pathogenesis of fever.
XI. Quantitative features of the febrile response to leucocytic pyrogen.
J. Exper. Med. 117, 349 (1963)
19. Brand, G.:
Zur Antigenstruktur des Influenzavirus.
Habilitationsschrift, Med. Fak.,
Freie Universität Berlin 1956

20. Brown, D.M. u.
P.Schell:
The reaction of hydroxylamine with cytosine and related compounds.
J. Mol. Biol. 3, 709 (1961)
21. Chiosa, L.,
F. Ionescu-Stoian u.
E. Falfanescu:
Die Auswahl der bei Pyrogenitätsprüfungen verwendeten Tiere.
Arzneimittelstandardisierung 1, 11 (1960)
22. Chiosa, L.,
F. Ionescu-Stoian u.
A. Bottesch:
Die Verwendung von Natriumnukleinat als Pyrogenstandard.
Arzneimittelstandardisierung 1, 19 (1966)
23. Cohn, Z.A. u.
S.I. Morse:
Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes.
I. Observations on the requirements and consequences of particle ingestion.
J. Exper. Med. 111, 667 (1960)
24. Cohn, Z.A. u.
S.I. Morse:
Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes.
II. The influence of a lipopolysaccharide endotoxin.
J. Exper. Med. 111, 689 (1960a)
25. Collins, R.D. u.
W.B. Wood, Jr.:
Studies on the pathogenesis of fever.
VI. The interaction of leucocytes and endotoxin in vitro.
J. Exper. Med. 110, 1005 (1959)
26. Cooke, P.M.:
Rickettsial and viral toxins.
Amer. J. Med. Sc. 241, 383 (1961)
27. Cooper, K.E. u.
W.I. Cranston:
Pyrogens and monoamine oxidase inhibitors.
Nature 210, 203 (1966)

28. Cooper, K.E.,
W.I. Cranston u.
A.J. Honour: The site of action of leucocyte pyrogen in the rabbit brain. J. Physiol. 186, 22 (1966)
29. Cranston, W.I.: Temperature regulation. Brit. Med. J. 2, 69 (1966)
30. Davenport, F.M.,
R. Rott u.
W. Schäfer: Physical and biological properties of influenza virus components obtained after ether treatment. J. Exper. Med. 112, 765 (1960)
31. Davenport, F.M.,
A.V. Hennessy,
F.M. Brandon,
R.G. Webster,
C.D. Barrett, Jr. u.
G.O. Lease: Comparisons of serologic and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 63, 5 (1964)
32. Deutsches Arzneibuch 6. Ausgabe, 3. Nachtrag 1959, S. XIV, S. 53.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M.B.H. Stuttgart,
Govi-Verlag G.m.b.H., Frankfurt/M
33. Dressel, H. u.
H.-J. Jacker: Zur Prüfung auf pyrogene Verunreinigungen, 3. Mitteilung: Untersuchung über die Eignung des Natriumnukleinats als Standard zur Prüfung auf Pyrogenempfindlichkeit. Arzneimittelstandardisierung 7, 313 (1966)
34. Eichenberger, E.: Fieber und endogene Hyperthermie durch pharmakologische, immunologische und physikalische Maßnahmen. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band 16, Teil 15 Springer-Verlag, 1966, S. 215

35. Falk, R.J.: The isolation of a mouse leucocytic pyrogen demonstrating its effect on the circadian temperature cycle of conditioned mice. Labor. Invest. 15, 1761 (1966)
36. Fellowes, O.N.: Hydroxylamine as an inactivating agent for foot-and-mouth disease virus. J. Immunol. 96, 772 (1966)
37. Fiszer-Szafarz, B.: Effect of human cancerous serum on the chick embryo. Cancer Res. 27, 191 (1967)
38. Forbes, I.J.: Induction of mitosis in macrophages by endotoxin. J. Immunol. 94, 37 (1965)
39. Franklin, R.M. u. E. Wecker: Inactivation of some animal viruses by hydroxylamine and the structure of ribonucleic acid. Nature 184, 343 (1959)
40. Freese, E., E. Bautz Freese u. S. Graham: The oxygendependent reaction of hydroxylamine with nucleotides and DNA. Biochim biophysica acta, N.Y. 122, 17 (1966)
41. French, E.L.: The pyrogenic effect of the influenzaviruses group of viruses in the laboratory rabbit. Austral. J. Exper. Biol. Med. Sci. 30, 479 (1952)
42. Frommhagen, L.H., C.A. Knight u. N.K. Freeman: The ribonucleic acid, lipid, and polysaccharide constituents of influenza virus preparations. Virology 8, 176 (1959)

43. Fukuda, T. u.
K. Murata:
Species difference in the febrile and the leucocytic response to endotoxin: Endogenous hepatic pyrogen in dogs.
Jap. J. Physiol. 15, 169 (1965)
44. Gendon, J.S.:
Ausnutzung von Hydroxylamin für die Zubereitung von inaktivierten Virusantigenen.
Medizina 4, 483 (1966)
45. Gillman, S.M.,
D.L. Bornstein u.
W.B. Wood, Jr.:
Studies on the pathogenesis of fever.
VIII. Further observations on the role of endogenous pyrogen in endotoxin fever.
J. Exper. Med. 114, 729 (1961)
46. Gimborn, H.:
Über die Kenntnisse der Pyrogene.
Beilage Nr. 9 zur "Die Pharmazie" Heft 9, 1963, S. 203
47. Göing, H. u.
P. Kaiser:
Aufbau und Wirkungsweise bakterieller Endotoxine.
In: Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und Experimentellen Therapie 1966, S. 243, Springer-Verlag
48. Greisman, S.E. u.
W.E. Woodward:
Mechanisms of endotoxin tolerance.
III. The refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin.
J. Exper. Med. 121, 911 (1965)
49. Großgebauer, K.:
Die Laboratoriumsdiagnose der Influenza (Virusgrippe).
Materia med. Nordmark 14, 142 (1962)

50. Großgebauer, K.: Über den Einfluß von Hydroxylamin auf die interferierende Aktivität von Influenzaviren. Zschr. Naturforsch. 20b, 717 (1965)
51. Großgebauer, K.: Der Einfluß von Hydroxylamin auf die antigene und interferierende Aktivität von Influenzaviren. Zschr. Naturforsch. 21b, 1063 (1966)
52. Großgebauer, K.: Ein Hämagglutinationstest zum Nachweis von Lysozym. Zschr. Blutforsch. 14, 93 (1966a)
53. Großgebauer, K.: Biologische Eigenschaften menschenpathogener Viren. Forschung-Praxis-Fortbildung 2, 288 (1966b)
54. Großgebauer, K.: Persönliche Mitteilung vom 1.7.1966, (1966c)
55. Großgebauer, K. u. H. Langmaack: Eine Verbesserung der intravenösen Injektionstechnik beim embryonierten Hühnerei. Zschr. med. Mikrobiol. u. Immunol. 153, 225 (1967)
56. Großgebauer, K.: Antagonistische Phänomene zwischen Viren und Bakterien. Arch. Hyg. 151, 146 (1967a)
57. Großgebauer, K.: Biologische Aktivitäten polyelektrolytwirksamer Makromoleküle. Arch. Hyg.: Im Druck (1967b)
58. Großgebauer, K.: Virusbedingtes Fieber. (Ergebnisse und Probleme). Klin. Wschr.: Im Druck (1967c)
59. Hadley, W.K., J.O'Rourke u. E. Atkins: Purification and characterization of an endogenous pyrogen. Yale J. Biol. Med. 38, 339 (1966)

60. Hammer, D.,
F. Goebel,
O. Westphal,
K. Sievers u.
O. Lüderitz:
Verhalten der Körpertemperatur
und des weißen Blutbildes vom
Pferd nach Injektion bakterieller
Lipopolysaccharide.
Zschr. Naturforsch. 13b, 561 (1958)
61. Hecht, G.:
In: Deutsches Arzneibuch, 6. Aus-
gabe, 3. Nachtrag 1959, S. 51.
Wissenschaftliche Verlagsgesell-
schaft M.B.H. Stuttgart,
Govi-Verlag G.m.b.H., Frankfurt/M.
62. Herion, J.C.,
J.K. Spitznagel,
R.I. Walker u.
H.I. Zeya:
Pyrogenicity of granulocyte lyso-
somes.
Amer. J. Physiol. 211, 693 (1966)
63. Ho, M.:
Interferon-like viral inhibitor
in rabbits after intravenous ad-
ministration of endotoxin.
Science 146, 1472 (1964)
64. Ho, M. u.
Y. Kono:
Effect of actinomycin D on virus
and endotoxin-induced interferon-
like inhibitors in rabbits.
Proc. Nat. Academy of Sciences
53, 220 (1965)
65. Ho, M.,
Y. Kono u.
M.K. Breinig:
Tolerance to the induction of in-
terferons by endotoxin and virus:
Role of a humoral factor.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 119,
1227 (1965)
66. Hort, E.C. u.
W.J. Penfold:
The dangers of saline injections.
Brit. Med. J. 2, 1589 (1911)
67. Hort, E.C. u.
W.J. Penfold:
Microorganisms and their relation
to fever.
J. Hyg. 12, 361 (1912)
68. Hoyle, L.:
The multiplication of influenza
viruses in the fertile egg.
J. Hyg. 48, 277 (1950)

69. Hoyle, L.: Structure of the influenza virus.
The relation between biological activity and chemical structure of virus fractions.
J. Hyg. 50, 229 (1952)
70. Kaiser, H.K. u.
W.B. Wood, Jr.: Studies on the pathogenesis of fever.
IX. The production of endogenous pyrogen by polymorphonuclear leucocytes.
J. Exper. Med. 115, 27 (1962)
71. Kaiser, H.K. u.
W.B. Wood, Jr.: Studies on the pathogenesis of fever.
X. The effect of certain enzyme inhibitors on the production and activity of leucocytic pyrogen.
J. Exper. Med. 115, 37 (1962a)
72. Ke, Y.H.,
S.H. Singer,
B. Postic u.
M. Ho: Effect of puromycin on virus and endotoxin-induced interferonlike inhibitors in rabbits.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 121, 181 (1966)
73. Kétyi, I.: Endotoxin-Wertmessung in Hühner-embryonen.
Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 192, 373 (1964)
74. Kim, Y.B. u.
D.W. Watson: Modification of host responses to bacterial endotoxins.
II. Passive transfer of immunity to bacterial endotoxin with fractions containing 19S antibodies.
J. Exper. Med. 121, 751 (1965)
75. King, M.K.: Production of fever in rabbits with extracts of tissue culture cells infected with Coxsackie virus.
J. Laborat. Clin. Med. 59, 986 (1962)

76. King, M.K.: Pathogenesis of fever in rabbits following intravenous injection of Coxsackie virus.
J. Laborat. Clin. Med. 63, 23 (1964)
77. King, M.K. u.
W.B. Wood, Jr.: Studies on the pathogenesis of fever.
III. The leucocytic origin of endogenous pyrogen in acute inflammatory exudates.
J. Exper. Med. 107, 279 (1958)
IV. The site of action of leucocytic and circulating endogenous pyrogen.
J. Exper. Med. 107, 291 (1958)
78. King, M.K. u.
W.B. Wood, Jr.: Studies on the pathogenesis of fever.
V. The relation of circulating endogenous pyrogen to the fever of acute bacterial infections.
J. Exper. Med. 107, 305 (1958a)
79. Kirn, A.,
A. Dammron,
J. Braunwald,
M. Lab u.
R. Wurtz: Rôle de la fièvre dans la Pneumonie Vaccinale du lapin.
Ann. Inst. Pasteur, Paris 110, 697 (1966)
80. Kongreßberichte: 18 Deutsche Therapie-Woche in Karlsruhe.
Referiert in: Med. Welt 17, 2159 (1966)
81. Lüderitz, O.,
D. Hammer,
F. Goebel,
K. Sievers u.
O. Westphal: Die Inaktivierung der endotoxischen Wirksamkeit bakterieller Lipopolysaccharide in Serum, Plasma und Vollblut vom Pferd.
Zschr. Naturforsch. 13b, 566 (1958)

82. Louie, R.E. u.
J. Fong:
Interaction between the soluble antigen of PR₈ and NWS virus.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 117, 200 (1964)
83. Lwoff, A.:
Rôle des facteurs non spécifiques au cours de l'infection virale primaire.
Path. Microbiol. 28, 147 (1965)
84. Lycke, E. u.
R. Norrby:
Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host cells.
Brit. J. Exper. Path. 47, 248 (1966)
85. Menkin, V.:
Biochemical mechanisms in inflammation.
Springfield, Ill., C.C. Thomas, 2. Ausgabe 1956
86. Mergenhagen, S.E. u.
G.R. Martin:
Properties of a lysozyme-dissociated endotoxic fraction from *Escherichia coli*.
J. Bact. 88, 1169 (1964)
87. Merker, H.J.:
Struktur und Funktion der Lyosomen.
Materia med. Nordmark 17, 684 (1965)
88. Merler, E.,
A. Perrault,
R.J. Trapani,
M. Landy u.
M.J. Shear:
Absence of endotoxic activity in materials derived without bacterial contamination from mammalian tissue.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 105, 443 (1960)
89. Mietens, C.:
Einfluß der Inaktivierung mit Hydroxylamin auf die Antigenität von Poliomyelitis N-Antigen.
Arch. Virusforsch. 18, 25 (1966)

90. Milner, K.C. u.
R.A. Finkelstein: Bioassay of endotoxin:
Correlation between pyrogenicity for rabbits and lethality for chick embryos.
J. Infect. Dis. 116, 529 (1966)
91. Neter, E.,
O. Westphal,
O. Lüderitz,
E.A. Gorzynski u.
E. Eichenberger: Studies of enterobacterial lipopolysaccharides.
Effect of heat and chemicals on erythrocyte-modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties.
J. Immunol. 76, 377 (1956)
92. Oh, J.O.: An interferon-like viral inhibitor in body fluids of endotoxin-injected rabbits.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 123, 493 (1966)
93. Oh, J.O.;
E.J. Gill: Role of interferon-like viral inhibitor in endotoxin-induced corneal resistance to Newcastle disease virus.
J. Bact. 91, 251 (1966)
94. Petersdorf, R.G. u.
I.L. Bennett: Studies on the pathogenesis of fever; species-specificity of endogenous serum pyrogen.
Amer. J. Med. 27, 320 (1959)
95. Petersdorf, R.G.,
J.A. Shulman u.
J.C. Ribble: The relationship of endogenous pyrogen to lysozyme.
Clin. Res. 8, 106 (1960)
96. Pollicard, A.: Le problème des lysosomes.
Nouv. Rev. Française d'Hématol. 5, 663 (1965)
97. Postic, B.,
C. DeAngelis,
M.K. Breinig u.
M. Ho: Effect of temperature on the induction of interferons by endotoxin and virus.
J. Bact. 91, 1277 (1966)

98. Powell, C.J. u.
R.A. Finkelstein: Virulence of *Escherichia coli* strains for chick embryos.
J. Bact. 91, 1410 (1966)
99. Reed, L.J. u.
H. Muench: A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938)
100. Rott, R.: Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen Partikels der Newcastle Disease und über die neben ihm auftretenden nichtinfektiösen virusspezifischen Einheiten.
Habilitationsschrift, Tübingen 1962
101. Rott, R. u.
G. Müller: Über den "toxischen Effekt" des Newcastle disease Virus.
Arch. Virusforsch. 17, 139 (1965)
102. Rudat, K.D.: Über pyrogene Stoffe und ihre Entfernung aus Injektionslösungen, Spritzen, Bluttransfusionsgeräten und anderem Sterilisiergut.
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 164, 370 (1955)
103. Ruiz-Gomez, J. u.
A. Isaacs: Optimal temperature for growth and sensitivity to interferon among different viruses.
Virology 19, 1 (1963)
104. Ruiz-Gomez, J. u.
J. Sosa-Martinez: Virus multiplication and interferon production at different temperatures in adult mice infected with Coxsackie B1 virus.
Arch. Virusforsch. 17, 295 (1965)

105. Schäfer, W. u.
R. Rott:
Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin. Verlauf der Inaktivierung und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren.
Zschr. Hyg. Infekt.-Kr. 148, 256 (1962)
106. Schmidt, B.:
Die Herstellung pyrogenfreier Lösungen im Apothekenbetrieb durch Membranfiltration.
Pharmaz. Ztg., Berlin 91-100, 1194 (1955)
107. Schmidt, B. u.
V. Blass:
Untersuchungen zur Frage der Entfernung von Pyrogenen aus Flüssigkeiten durch Filtration.
Zschr. Hyg. 142, 183 (1955)
108. Schmidt, G.,
K. Großgebauer u.
B. Schmidt:
Die selektive Zerstörung der pyrogenen Aktivität von Influenzaviren durch Hydroxylamin.
Arch. Virusforsch. 18, 105 (1966)
109. Scholtissek, C.:
Biochemische Studien zur Vermehrung der Myxoviren.
Habilitationsschrift, Dortmund, veröffentl. in:
Zbl. Veter.-Med. Reihe B, 12, 351 (1965)
110. Schuster, H.:
The reaction of tobacco mosaic virus ribonucleic acid with hydroxylamine.
J. Mol. Biol. 3, 447 (1961)
111. Seibert, F.B.:
Fever-producing substance found in some distilled waters.
Amer. J. Physiol. 67, 90 (1923)

112. Seibert, F.B.: Pyrogens from an Historical Viewpoint.
Transfusion 3, 245 (1963)
113. Seibert, F.B. u. L.B. Mendel: Temperature variations in rabbits.
Amer. J. Physiol. 67, 83 (1923)
114. Shulman, J.A. u. R.G. Petersdorf: Relationship of endogenous pyrogen to lysozyme.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 114, 376 (1963)
115. Shulman, J.A. u. R.G. Petersdorf: Relationship of endogenous pyrogen and serum augmenting factor to endotoxin tolerance.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 119, 218 (1965)
116. Siegert, R.: Natur und Wirkungsmechanismus der Viruspyrogene.
Klin. Wschr. 35, 652 (1957)
117. Siegert, R., E. Betz u. G. Schmidt: Zur Problematik des Pyrogenbegriffs, dargestellt am Beispiel der Viruspyrogene.
Festschrift zur 100-Jahrfeier der Farbwerke Höchst 1963, S.255
118. Siegert, R. u. P. Braune: The pyrogens of myxoviruses.
I. Induction of hyperthermia and its tolerance.
Virology 24, 209 (1964)
119. Siegert, R. u. P. Braune: The pyrogens of myxoviruses.
II. Resistance of Influenza A pyrogens to heat, ultraviolet, and chemical treatment.
Virology 24, 218 (1964a)

120. Siegert, R.,
H.L. Shu,
W. Pollmann u.
H. Menzel:
Untersuchungen über Viruspyrogene.
I.Mitt.: Versuche zur Abtrennung
des pyrogenen Prinzips von Myxo-
viren.
Zschr. Naturforsch. 22b, 155
(1967)
121. Slifkin, M. u.
P. Isacson:
Nontransmissible lysis of mouse
leukemia cells by myxoviruses.
J. Infect. Diseases. 115, 33 (1965)
122. Smith, R.T. u.
L. Thomas:
The lethal effect of endotoxins
on the chick embryo.
J. Exper. Med. 104, 217 (1956)
123. Snell, E.S. u.
E. Atkins:
The presence of endogenous py-
rogen in normal rabbit tissues.
J. Exper. Med. 121, 1019 (1965)
124. Stickl, H. u.
H. Böcker:
Wirkungen des Influenzavirus.
Fieber und Entzündung.
Z. Kinderheilk. 81, 389 (1958)
125. Stickl, H.:
Gibt es ein Virustoxin?
Dtsch. med. Wschr. 88, 639 (1963)
126. Stinebring, W.R. u.
J.S. Youngner:
Patterns of interferon appea-
rance in mice injected with
bacteria or bacterial endotoxin.
Nature 204, 712 (1964)
127. Thomas, L.:
The role of lysosomes in tissue
injury.
In: The Inflammatory Process
Academic Press;
New York, London 1965, S. 449
128. Valyi-Nagy, T. u.
B. Kelentey:
Über die Pyrogene.
Pharmazie, Berlin 5, 245 (1959)
129. Wagner, R.:
Über Wesen und Bedeutung biolo-
gischer Regelung.
Materia med. Nordmark 13/8, 297
(1961)

130. Wagner, R.R.,
I.L. Bennett, Jr. u.
V.S. Lequire:
The production of fever by influenza viruses.
I. Factors influencing the febrile response to single injections of virus.
J. Exper. Med. 90, 321 (1949)
131. Wagner, R.R. u.
I.L. Bennett, Jr.:
The production of fever by influenza viruses.
III. Effect of receptor-destroying substances.
J. Exper. Med. 91, 135 (1950)
132. Warren, J.,
K. Takano,
A.L. Neal u.
K.E. Jensen:
Potentiating action of protamine sulfate on nucleic acid induced, non-specific resistance.
Arch. Virusforsch. 17, 522 (1965)
133. Watson, D.W. u.
Y.B. Kim:
Modification of host responses to bacterial endotoxins.
I. Specificity of pyrogenic tolerance and the role of hypersensitivity in pyrogenicity, lethality, and skin reactivity.
J. Exper. Med. 118, 425 (1963)
134. Wendt, F.:
Neue Ergebnisse der Pyrogenforschung.
Bakterielle Pyrogene.
Dtsch. med. Wschr. 84, 2084 (1959)
135. Westphal, O.:
Aufbau der O-Endotoxine.
Aus: Grundriß der medizinischen Immunologie
von Priv. Doz. Dr. F. Müller,
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
1963, S. 33
136. Westphal, O. u.
O. Lüderitz:
Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien.
Angew. Chem. 66, 407 (1954)

137. Westphal, O.,
D. Hammer,
O. Lüderitz,
A. Nowotny,
E. Eichenberger u.
F. Goebel:
Die Inaktivierung der endotoxi-
schen Lipoid-Komponente (Lipoid A)
bakterieller Lipopolysaccharide
durch Pferdeserum.
Zschr. Naturforsch. 13b, 572
(1958)
138. Wood, W.B., Jr.:
Die Pathogenese des Fiebers.
Das Medizinische Prisma 3, (1966)
C.H. Boehringer & Sohn, Ingel-
heim am Rhein
139. Wood, W.B., Jr.,
M.R. Smith,
W.D. Perry u.
J.W. Berry:
Studies on the cellular immuno-
logy of acute bacteriemia.
I. Intravascular leucocytic re-
action and surface phagocytosis.
J. Exper. Med. 94, 521 (1951)
140. Zeller, H. u.
H. Oettel:
Zur Dosisabhängigkeit pyrogener
Reaktionen.
Pharmaz. Industrie 27, 763 (1965)
141. Zeller, H. u.
H. Oettel:
Zur Dosisabhängigkeit pyrogener
Reaktionen (Kurzfassung).
Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 198,
243 (1965a)

Lebenslauf

Als Tochter des Arztes Dr. med. Bernhard Schmidt und seiner Ehefrau Erika, geb. Stiefelmayer, wurde ich, Gisela Schmidt, am 21. 7. 1937 in Göttingen geboren.

Meine Schulausbildung erfolgte in Eßlingen/N., Frankfurt/M. und Berlin; die Reifeprüfung legte ich im Frühjahr 1957 am Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf ab.

Meine Ausbildung als Apothierpraktikantin erhielt ich in der Apotheke des Städtischen Rudolf Virchow-Krankenhauses und in der Fichtenberg-Apotheke in Berlin. Im Frühjahr 1960 beendete ich diesen Ausbildungsabschnitt in Berlin mit der pharmazeutischen Vorprüfung, die mit der Note "gut" bewertet wurde.

Vom Sommer-Semester 1960 bis zum Sommer-Semester 1963 studierte ich an der Freien Universität Berlin Pharmazie und bestand dort am 19. 11. 1963 das pharmazeutische Staatsexamen mit der Note "gut".

Vom 1. 1. 1964 bis Ende 1964 leistete ich mein Kandidatenjahr in der Stadt-Apotheke in Starnberg (Oberbayern) ab. Mit Wirkung vom 1. 1. 1965 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Anschließend widmete ich mich im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin der weiteren naturwissenschaftlichen Fortbildung auf virologischem Gebiet und fertigte meine Dissertationsarbeit an.

